

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO HENRIQUE DE MEDEIROS BUSO

**CONTRIBUIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO
VEGETAL COINOCULADOS NA CULTURA DA SOJA**

CURITIBA

2017

PEDRO HENRIQUE DE MEDEIROS BUSO

**CONTRIBUIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO
VEGETAL COINOCULADOS NA CULTURA DA SOJA**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Manejo de Culturas, no Curso de
Pós-Graduação em Produção Vegetal, Setor de
Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Augusto de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Edelclaiton Daros
Co-orientador: Prof. Dr. José Luis Camargo Zambon

CURITIBA

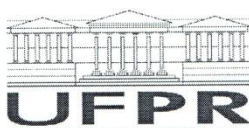
2017

B979 Buso, Pedro Henrique de Medeiros
Contribuição de micro-organismos promotores do crescimento vegetal coinoculados na cultura da soja. / Pedro Henrique de Medeiros Buso. - Curitiba: 2017.
94 f.; il.

Orientador: Ricardo Augusto de Oliveira
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal.

1. Soja. 2. Microorganismos do solo. 3. Crescimento (Plantas).
I. Oliveira, Ricardo Augusto de. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal. III. Título.

CDU 633.34



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PEDRO HENRIQUE DE MEDEIROS BUSO** intitulada: **CONTRIBUIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL COINOCULADOS NA CULTURA DA SOJA**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Maio de 2017.


RICARDO AUGUSTO DE OLIVEIRA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


EDSON LUIS SOUCHIE
Avaliador Externo (IFGoiano)


JOSÉ LUIS CAMARGO ZAMBON
Avaliador Externo (UFPR)


EDELCLAITON DAROS
Avaliador Interno (UFPR)


WILSON STORY VENÂNCIO
Avaliador Externo (UEPG)

Dedico

À minha querida esposa Ellen, sempre ao meu lado ao longo desta caminhada, persistente e determinada, cuja companhia tem sido fundamental em todos os momentos.

Aos meus filhos Artur Piffer Buso e irmão.

Aos meus pais Paulo e Lígia, pelo incentivo, carinho e dedicação.

Aos meus irmãos Luis Gustavo e Paola.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela luz e saúde, essencial para seguirmos.

Ao professor Ricardo Augusto Oliveira, pelo companheirismo de longa data, por acreditar no trabalho proposto em conjunto.

Aos professores Edelclaiton Daros e José Luis Camargo Zambon pelas sugestões, revisões e correções ao longo de toda minha carreira acadêmica, pelo convívio e aprendizado.

Aos professores Wilson Venâncio e Edson Souchie, que ajudaram na compreensão sobre micro-organismos e suas habilidades.

À Engenheira Agrônoma Dra. Ellen Karine R. P. de Medeiros Buso, sempre ordeira e determinada nos momentos em que eu já não tinha mais energia. Estendo o agradecimento à minha sogra Wilma Piffer e família, pela ajuda com as avaliações e cuidados com o Artur.

À Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG) e seus colaboradores, pela ajuda na condução dos experimentos de campo.

Aos amigos Engenheiros Agrônomos Heroldo Weber, Guilherme Berton e Hugo Zeni, pelo apoio e amizade.

Aos amigos Jose Luiz Tavares, Luis Claudio Silveira, Geraldo Veríssimo, Antônio Marcos Iaia, Antonio Ribeiro, Mario Veríssimo e João Civieiro, pelo companheirismo ao longo das disciplinas e trabalhos.

Aos estudantes Rodrigo Neidert e Thiago Agnes Bruno, que ajudaram na condução dos trabalhos, incansáveis aos domingos e feriados, noite adentro.

À RIDESA/FUNPAR, Novozymes BioAg e Monsanto do Brasil pelo apoio e confiança depositada, essencial para a realização do trabalho.

À Maria Emilia Kudla, Rainério, Adriana P. das Neves e Djennifer Daminsky pela ajuda na condução dos ensaios controlados e análise das amostras e plantas.

À Instituição UFPR/SCA/Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo e ao Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela confiança e oportunidade.

Aos dedicados professores que tive ao longo da vida, certos de haverem contribuído para esta conquista.

À minha família que soube entender minha ausência em alguns momentos.

E àqueles que, direta ou indiretamente contribuíram na minha jornada, e incentivaram, mesmo que discretamente, na concretização deste sonho.

BIOGRAFIA

PEDRO HENRIQUE DE MEDEIROS BUSO, filho de Paulo José Buso Junior e Lígia Franco de Medeiros Buso, nasceu em Jacarezinho, Estado do Paraná, em 16 de setembro de 1980.

Passou a infância e adolescência em Santo Antonio da Platina, onde iniciou sua vida acadêmica. Filho de produtores rurais, cresceu no campo entre as lavouras de café e cana-de-açúcar, e o rebanho Nelore.

Tomado gosto pelo rurícola, no segundo semestre de 1998, ingressou no Curso de Agronomia na Universidade Federal do Paraná, no qual recebeu o grau de Engenheiro Agrônomo no ano de 2003.

De 2001 a 2004, foi estagiário do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar / RIDESA / UFPR. Em março de 2004, ingressou no Programa de Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo na mesma universidade, concluindo o curso em agosto de 2006.

Trabalhou como produtor rural entre os anos de 2004 e 2008. Em outubro de 2008 foi convidado a reintegrar a equipe do PMGCA/RIDESA, trabalhando como melhorista de cana-de-açúcar, sediado na Estação Experimental de Cana-de-açúcar, em Paranavaí, até o ano 2013.

Em junho de 2013, assumiu a posição de Especialista em Agronomia, na empresa Novozymes BioAg, e responsável pelos testes, a campo, de eficiência agrônômica do portfólio no Brasil. Ainda neste ano, ingressou no Programa de Doutorado em Produção Vegetal, Ciências Agrárias da UFPR.

Foi transferido para a Monsanto do Brasil em 2014, quando esta empresa, junto com a Novozymes, anunciaram a *BioAg Alliance*, onde permanece testando a eficiência agrônômica de produtos para tratamento químico e biológico de sementes até os dias atuais, integrando a equipe de *Seed Applied Solutions*, na área de *Technology Development* para a região tropical e subtropical da América do Sul.

"É muito melhor arriscar coisas
grandiosas, alcançar triunfos e glórias,
mesmo expondo-se à derrota, do que
formar fila com os pobres de espírito, que
nem gozam muito, nem sofrem muito,
porque vivem nessa penumbra cinzenta,
que não conhece vitória nem derrota"
(Roosevelt, 1924)

RESUMO

Ocupando cerca de 34 milhões de hectares e gerando aproximadamente 114 milhões de toneladas de grãos a cada safra, a soja tem grande importância para o Brasil, onde tem-se obtido excelentes rendimentos ao longo dos anos, seja pelo favorecimento do ambiente ou pela adoção de tecnologias que possibilitam elevados índices produtivos. Nos últimos anos, pesquisadores fizeram grande progresso no entendimento dos micro-organismos do solo e seu papel no ecossistema. Com este trabalho objetivou-se compreender o efeito dos micro-organismos inoculados e coinoculados em plantas de soja. Para tal, em três capítulos, avaliaram-se e apresentaram-se as seguintes realizações: i) avaliar o efeito da coinoculação de diferentes micro-organismos em sementes de soja e determinar as respostas dos tratamentos em estádios vegetativos três e sete, visando seu potencial uso como coinoculante.; ii) avaliar plantas de soja coinoculadas com bactérias e fungos promotores do crescimento vegetal, por meio da análise de crescimento, visando determinar quais variáveis de crescimento e fisiológicas são alteradas, e em que momento as plantas apresentam estímulos provenientes dos micro-organismos coinoculados; iii) comparar a resposta das plantas de soja submetidas à aplicação de quatro combinações de micro-organismos promotores de crescimento vegetal, em duas safras consecutivas, na fase V6 das plantas e seu rendimento (R8). Os resultados indicam que: em câmara de crescimento as plantas de soja inoculadas com *P. bilaiae*, apresentaram aumento no número de nódulos nas raízes. A coinoculação com *A. brasilense* AbV05 e 06, e Az 39 e *P. bilaiae*, proporciona maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas, quando cultivadas em ambiente controlado. Na coinoculação em casa de vegetação com substrato terra, os tratamentos *T. asperellum* e *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* proporcionaram maior desenvolvimento do sistema radicular. Os micro-organismos *T. asperellum* e *P. bilaiae* coinoculados aumentaram a taxa de crescimento absoluto até V5 e taxa de assimilação líquida em toda a fase vegetativa, e, proporcionou acúmulo de massa seca de parte aérea e total no final do período reprodutivo. Os micro-organismos *A. brasilense*; *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* coinoculados com *B. japonicum* em sementes de soja são capazes de aumentar a taxa de crescimento relativo entre V2 e R1, a razão de área foliar e razão de massa de raízes na fase vegetativa, e a taxa de crescimento absoluto entre V7 e R5. A coinoculação de *T. asperellum* e *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* aumentou a taxa de crescimento absoluto de raízes entre V7 e R1, e taxa de crescimento relativo de raízes entre V3 e V4. Neste ensaio, as respostas das variáveis massa seca de parte aérea, massa seca de raízes, número de nódulos nas raízes secundárias, massa seca de nódulos nas raízes secundárias, comprimento total de raízes, área projetada de raízes, superfície específica de raízes, número de pontas e índice de área foliar foi observada no ano com disponibilidade hídrica inferior. O cultivo da soja é estimulado pelo uso de micro-organismos coinoculados nas sementes, apresentando resposta de aumento de rendimento quando combinado *P. bilaiae* com *B. japonicum*. Os resultados desse estudo servirão de subsídio para mostrar ao setor o potencial dos micro-organismos, onde seu efeito é mais evidente, e, em que momento do desenvolvimento da soja esperar tais respostas.

Palavras-chave: *Glycine max*, coinoculação, nodulação, matéria seca, taxa.

ABSTRACT

Occupying around 34 million hectares and generating approximately 114 million tons of grain per season, soybeans are important to Brazil, where excellent yields have been obtained over the years, either favored by environment or by adopted technologies that allow high production rates in different regions. In recent years, researchers have made great strides understanding soil microorganisms and their ecosystem's role, especially in plant growth. This work aimed to understand the effect of inoculated and co-inoculated microorganisms on soybean plants. In order to achieve this objective, in three chapters, the following results were evaluated and presented: i) to evaluate the effect of the co-inoculation of different microorganisms on soybean seeds and to determine the responses of treatments in vegetative stages three and seven, aiming at their potential use as coinoculant.; ii) evaluate soybean plants coinoculated with plant growth promoting bacteria and fungi, through growth analysis, to determine which growth and physiological variables are altered, and determine stimulated plants structures by coinoculated microorganisms; iii) to compare the response of soybean plants submitted to the application of four combinations of plant growth promoter microorganisms, in two consecutive seasons, in the V6 phase and their yield (R8). The results indicate that at growth chamber, the soybean plants inoculated with *P. bilaiae* showed an increase in the roots number of nodules. The co-inoculation with *A. brasilense* AbV05 and 06, and Az 39 and *P. bilaiae*, provides greater development of the root system, when cultivated in a controlled environment. In the greenhouse co-inoculation with land substrate, treatments *T. asperellum* and *T. virens* and *B. amyloliquefaciens* provided greater development of the root system. The microorganisms *T. asperellum* and *P. bilaiae* coinoculated increased the absolute growth rate up to V5 and net assimilation rate throughout the vegetative phase, and provided a dry mass accumulation of shoot and total mass at the end of the reproductive period. The microorganisms *A. brasilense*; *T. virens* and *B. amyloliquefaciens* coinoculated with *B. japonicum* in soybean seeds can increase the relative growth rate between V2 and R1, the leaf area ratio and root mass ratio in the vegetative phase, and the growth rate between V7 and R5. The co-inoculation of *T. asperellum* and *T. virens* and *B. amyloliquefaciens* increased the absolute root growth rate between V7 and R1, and the relative growth rate of roots between V3 and V4. In this essay, the responses of the dry matter variables of root shoot, dry mass of roots, number of nodules in secondary roots, dry mass of nodules in secondary roots, total root length, projected roots area, root specific surface, number of roots tips and leaf area index was observed in the year with lower water availability. The soybean cultivation is stimulated by coinoculated microorganisms use in seeds, presenting an increased yield response when combined *P. bilaiae* with *B. japonicum*. The results of this study will serve as a subsidy to show the potential of the microorganisms, where their effect is most evident, and at what time of soybean development are expected such responses.

Key-words: *Glycine max*, coinoculation, nodulation, dry mass, rate.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – ANÁLISE DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE SOJA INOCULADAS E COINOCULADAS

- Figura 1 – A) massa seca da parte aérea – MSPA; B) massa seca total – MST; C) massa seca de folhas - MSF; e D) massa seca de raízes – MSR; por metro quadrado, em nove épocas de avaliação de plantas de soja inoculada com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*; *T. asperellum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* e *P. bilaiae*. Experimento realizado em Palmeira, PR, safra 2015/16. Curitiba, PR, 2017..... 52
- Figura 2 – A) taxa de crescimento absoluto – TCA; B) taxa de crescimento de raízes – TCAR; C) taxa de crescimento relativo – TCR; D) taxa de crescimento relativo de raízes – TCRR; em nove épocas de avaliação de plantas de soja inoculada com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*; *T. asperellum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* e *P. bilaiae*. Experimento realizado em Palmeira, PR, safra 2015/16. Curitiba, PR, 2017..... 55
- Figura 3 – A) índice a área foliar – IAF; B) taxa de assimilação líquida – TAL; C) razão de área foliar – RAF e D) razão de massa de raízes – RMR em nove épocas de avaliação de plantas de soja inoculada com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*; *T. asperellum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* e *P. bilaiae*. Experimento realizado em Palmeira, PR, safra 2015/16. Curitiba, PR, 2017..... 57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE SOJA EM CÂMARA DE CRESCIMENTO E CASA DE VEGETAÇÃO, INOCULADAS E COINOCULADAS COM MICRO-ORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL.

Tabela 1 - Número de nódulos totais (NT), número de nódulos da raiz principal (NRP), comprimento da raiz principal (CRP), massa seca de raízes (MSR), comprimento total de raízes (CTR), superfície específica (SE) e volume de raízes (V) por planta de soja, em câmara de crescimento (CC), no município de Quatro Barras. Curitiba, PR, 2017.....	33
Tabela 2 - Comprimento (CR) e volume (V) para classes de diâmetro de raízes entre 1,5 e 2,0 mm, 2,0 e 2,5 mm, 2,5 e 3,0 mm, 4,0 e 4,5 mm e maiores que 4,5 mm, por plantas soja, em câmara de crescimento (CC), no município de Quatro Barras. Curitiba, PR, 2017.....	35
Tabela 3 - Massa seca de raízes (MSR) considerando todos os diâmetros; e comprimento (CR), área projetada (AP), superfície específica (SE) e volume (V) para raízes de diâmetro maior que 3,5 mm e menor ou igual a 4,0 mm, por planta de soja, em casa de vegetação (CVeg), no Setor de Ciências Agrárias, UFPR, Curitiba, PR. Curitiba, PR, 2017.....	37

CAPÍTULO II – ANÁLISE DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE SOJA COINOCULADAS

Tabela 1 - Temperatura máxima média (°C), temperatura mínima média (°C) e precipitação (mm) nos meses de novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março, na safra 15/16 e média histórica (1989-2015) para a Região de Palmeira, PR. Curitiba, PR, 2017.	47
Tabela 2 - Tratamentos, micro-organismos e doses utilizadas no tratamento de sementes de soja, em ensaio em campo, realizado na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais, município de Palmeira, PR, nas safras 2015/16. Curitiba, PR, 2017.	48
Tabela 3 – Avaliações, datas das avaliações, dias após o plantio (DAP) e estádios, do ensaio conduzido Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), município de Palmeira, PR. Curitiba, PR, 2017.....	49

CAPÍTULO III – INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO EM SOJA A CAMPO: RESPOSTA NO ESTÁDIO VEGETATIVO E NO RENDIMENTO AGRÍCOLA

Tabela 1 - Temperatura máxima média (°C), temperatura mínima média (°C) e precipitação (mm) nos meses de novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março, nas safras 14/15 e 15/16 na Estação	
--	--

	Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), e série histórica (1989-2015). Curitiba, 2017.....	66
Tabela 2 –	Cultivar, data de plantio, data de emergência, adubação de base, formulação de adubação, espaçamento, densidade de plantio, cultura antecessora, data de avaliação e de colheita dos experimentos de soja, conduzidos na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), município de Palmeira, PR, nas safras 2014/15 e 2015/16. Curitiba, PR, 2017.....	67
Tabela 3 -	Tratamentos, micro-organismos e doses utilizadas no tratamento de sementes de soja, nos experimentos em campo, conduzidos na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais, município de Palmeira, PR, nas safras 2014/15 e 2015/16. Curitiba, PR, 2017.....	68
Tabela 4 -	Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), número de nódulos nas raízes secundárias (NRS), massa seca de nódulos nas raízes secundárias (MSNRS), comprimento total de raízes (CTR), área projetada de raízes (AP), superfície específica de raízes (SE), número de pontas (P) e índice de área foliar (IAF), interação dos fatores de variação safra e tratamentos, em experimentos de soja conduzidos a campo, na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais, município de Palmeira, PR, nas safras 2014/15 e 2015/16. Curitiba, PR, 2017.....	70
Tabela 5 –	Estatura de plantas (H), comprimento da raiz principal (CRP), número de nódulos na raiz principal (NRP), número de nódulos totais (NT), massa seca de nódulos na raiz principal (MSNRP), diâmetro médio (D), volume de raízes (V), número de folhas (NF), área foliar por planta (AF) e rendimento (Rend.) de soja, para os fatores de variação e tratamentos, ensaios realizados a campo, nas safras 14/15 e 2015/16, na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), no município de Palmeira, PR. Curitiba, 2017.	72

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – PRECIPITAÇÃO, TEMPERATURA MÁXIMA E TEMPERATURA MÍNIMA DIÁRIA NOS MESES DE NOVEMBRO E DEZEMBRO DE 2014, JANEIRO, FEVEREIRO, MARÇO E ABRIL DE 2015, REFERENTES AO ANO SAFRA 2014/2015, NA EEACG, MUNICÍPIO DE PALMEIRA, PR. CURITIBA, 2017.	91
APÊNDICE B – PRECIPITAÇÃO, TEMPERATURA MÁXIMA E TEMPERATURA MÍNIMA DIÁRIA NOS MESES DE NOVEMBRO E DEZEMBRO DE 2015, JANEIRO, FEVEREIRO, MARÇO E ABRIL DE 2016, REFERENTES AO ANO SAFRA 2015/2016, NA EEACG, MUNICÍPIO DE PALMEIRA, PR. CURITIBA, 2017.	92
APÊNDICE C – DADOS DE MANEJO DE ERVAS INVASORAS, PRAGAS E DOENÇAS, DATAS, PERÍODO DO DIA, TEMPERATURA (TEMP.), UMIDADE RELATIVA DO AR (UR) EM QUE OCORRERAM AS APLICAÇÕES, PRODUTOS, SUAS CONCENTRAÇÕES E DOSE UTILIZADAS NOS ENSAIOS CONDUZIDOS NA EEACG, EM PALMEIRA, PR, NA SAFRA 2014/15. CURITIBA, PR, 2017	93
APÊNDICE D – DADOS DE MANEJO DE ERVAS INVASORAS, PRAGAS E DOENÇAS, DATAS, PERÍODO DO DIA, TEMPERATURA (TEMP.), UMIDADE RELATIVA DO AR (UR) EM QUE OCORRERAM AS APLICAÇÕES, PRODUTOS, SUAS CONCENTRAÇÕES E DOSE UTILIZADAS NOS ENSAIOS CONDUZIDOS NA EEACG, EM PALMEIRA, PR, NA SAFRA 2015/16. CURITIBA, PR, 2017	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3	REFERÊNCIAS.....	21
4	CAPÍTULO I – CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE SOJA EM CÂMARA DE CRESCIMENTO E CASA DE VEGETAÇÃO, COINOCULADAS COM MICRO-ORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	26
4.1	INTRODUÇÃO	28
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.3.1	Experimento em câmara de crescimento.....	32
4.3.2	Experimento em casa de vegetação.....	36
4.4	CONCLUSÕES	38
4.5	REFERÊNCIAS.....	39
5	CAPÍTULO II – ANÁLISE DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE SOJA COINOCULADAS.....	43
5.1	INTRODUÇÃO	45
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	46
5.2.1	Caracterização do experimento	46
5.2.2	Material vegetal	47
5.2.3	Tratamentos aplicados	48
5.2.4	Amostragem e unidades experimentais.....	48
5.2.5	Avaliações	49
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.4	CONCLUSÕES	58
5.5	REFERÊNCIAS	59
6	CAPÍTULO III – INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO EM SOJA A CAMPO: RESPOSTA NO ESTÁDIO VEGETATIVO E NO RENDIMENTO AGRÍCOLA	62
6.1	INTRODUÇÃO	64
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	65
6.2.1	Caracterização do experimento	65
6.2.2	Sementes e características	66
6.2.3	Ensaio e manejo do cultivo	67

6.2.4	Tratamentos e delineamento experimental	67
6.2.5	Coletas das amostras	68
6.2.6	Análises.....	68
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.4	CONCLUSÕES	74
6.5	REFERÊNCIAS.....	75
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
8	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A soja tem grande importância para o Brasil, ocupando cerca de 34 milhões de hectares e gerando aproximadamente 114 milhões de toneladas de grãos a cada safra. 5,2 milhões de hectares são cultivados no Paraná, com rendimento médio de 3.362 e 3.721 kg.ha⁻¹, respectivamente. Na região Centro-Sul do Paraná tem-se obtido excelentes rendimentos ao longo dos anos, seja pelo favorecimento do ambiente ou pela adoção de tecnologias que possibilitam elevados índices produtivos. Está presente nas rações para animais, sendo também fonte de proteínas e óleos também na cadeia alimentar humana (CONAB, 2017).

A sustentabilidade deste sistema de produção agrícola é uma forma de segurança alimentar. Nos últimos anos, pesquisadores fizeram grande progresso no entendimento dos micro-organismos do solo e seu papel no ecossistema (PEREG & MCMILLAN, 2015) e dividiu-se os inoculantes microbianos em três grandes grupos, de acordo com suas características: fungos micorrízicos arbusculares (FMA), promotores de crescimento vegetal (PGPR) e rizóbios simbióticos fixadores de nitrogênio (N) (biofertilizantes). Ainda que algumas destas características estejam presentes simultaneamente nos mesmos micro-organismos, a capacidade benéfica de cada grupo tem sido estudada separadamente (VERMA et al., 2010). Além disso, estão sendo conduzidos numerosos estudos para avaliar os efeitos do crescimento de plantas aplicando diferentes combinações ou consórcios microbianos (SWARNALAKSHMI et al., 2013).

Rizobactérias que promovem o crescimento das plantas através da melhoria da absorção de nutrientes das plantas são denominadas biofertilizantes. Estas bactérias têm um papel de melhorar o estado nutricional das plantas, por meio da fixação biológica de N (FBN) constituinte do ar, estas bactérias formam uma estrutura própria nas raízes das leguminosas, chamadas nódulos. Dentro dos nódulos, as bactérias capturam o N₂ do ar e o transformam em nitrito, nitrato ou amônia para que seja assimilado pela planta. Essas formas de N não são abundantes na maioria dos solos e a fertilização nitrogenada química empregada na agricultura é frequentemente perdida por chuvas ou lixiviação (MURRAY, 2011).

Várias bactérias de vida livre, não simbióticas, foram identificadas como fixadoras de N₂ (*Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bacillus polymyxa*, *Burkholderia*, *Gluconoacetobacter* ou *Herbaspirillum*). Estes potenciais promotores

do crescimento vegetal podem favorecer cultivos importantes como o trigo, o sorgo, o milho, o arroz ou cana-de-açúcar. A inoculação destas espécies normalmente aumenta a massa seca da planta, a produção de flores e de grãos. Além do N, outros minerais podem ser disponibilizados com a ajuda dos micro-organismos biofertilizantes, incluindo alguns fungos, que acidificam a rizosfera solubilizando fósforo, podendo aumentar a absorção de vários outros nutrientes como Ca, K, Fe, Cu, Mn e Zn (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

O estímulo direto de crescimento da planta é outro estímulo atribuído aos micro-organismos promotores do crescimento, especialmente por alterar a arquitetura da raiz e promover o desenvolvimento vegetal, devido à sua capacidade de sintetizar e secretar ácido indol-3-acético (IAA), giberelinas (GAs), citocininas, além de alguns compostos voláteis (BOIERO et al., 2007). Por exemplo, a biossíntese de IAA pelos micro-organismos foi responsável pelo aumento da formação de raízes (DOBBELAERE et al., 2003). Tais fitormônios também são utilizados pelas bactérias para interagir com as plantas, como parte de sua estratégia de comunicação e colonização, evitando os mecanismos basais de defesa da planta (SPAEPEN et al., 2007). Embora estudos com as GAs comprovem ganhos na formação inicial de raízes, divisão celular, aumento de células e aumento da área da superfície radicular das plantas, a função das GAs ainda não foi claramente definida. Acredita-se que a sua principal função esteja associada à comunicação e sinalização para a planta hospedeira, por isso existem muitos estudos onde a produção de GA por *Azospirillum* ou *Bacillus* spp. induz a promoção do crescimento em plantas (GLICK, 2012).

Estudos da inoculação simultânea de vários micro-organismos (coinoculação) em soja estão sendo realizados por alguns pesquisadores, testando como coinoculantes, além do *Rhizobium*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *A. brasiliense*, *Serratia proteomaculans*, *Serratia liquefaciens* e *Pseudomonas aureofaciens*. Muitos destes estudos objetivam as interações fisiológicas entre os micro-organismos e as plantas, sem relacionar a coinoculação com rendimento, ou sequer com alguma variável morfológica resposta (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Os micro-organismos tem potencial de contribuir com o aumento da produtividade das lavouras, uma vez que não são poluentes, melhoram a eficiência do uso da água e nutrientes, são de utilização simples e, em geral, sua aplicação tem baixo custo comparado a outros produtos da cadeia, com rentabilidade.

Considerando-se a importância da cultura da soja, e as vantagens que o uso dos micro-organismos pode trazer, com este trabalho objetivou-se compreender o efeito dos micro-organismos inoculados e coinoculados em plantas de soja. Para tal, em três capítulos, avaliaram-se e apresentaram-se as seguintes realizações: i) avaliar o efeito da coinoculação de diferentes micro-organismos em sementes de soja e determinar as respostas dos tratamentos em estádios vegetativos três e sete, visando seu potencial uso como coinoculante.; ii) avaliar plantas de soja coinoculadas com bactérias e fungos promotores do crescimento vegetal, por meio da análise de crescimento, visando determinar quais variáveis de crescimento e fisiológicas são alteradas, e em que momento as plantas apresentam estímulos provenientes dos micro-organismos coinoculados; iii) comparar a resposta das plantas de soja submetidas à aplicação de quatro combinações de micro-organismos promotores de crescimento vegetal, em duas safras consecutivas, na fase V6 das plantas e seu rendimento (R8).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A diversidade da vegetação natural contribui para aumentar a biodiversidade do solo, enquanto que os intensos monocultivos restringem as populações microbianas do solo, causando a redução da biodiversidade (FIGUEROLA et al., 2014). Além disso, a utilização de fertilizantes e pesticidas pode comprometer tanto a atividade quanto a sobrevivência de certas espécies microbianas nos solos. Neste sentido, a relação entre a atividade humana e a biodiversidade do solo é intimamente relacionada com as práticas de gestão agrícola (REEVE et al., 2010).

Por sua vez, o fornecimento de fertilizantes nitrogenados possui baixa eficiência de utilização por parte da planta, devido às perdas por lixiviação e volatilização. No caso da soja, que exporta cerca de 240 kg.ha^{-1} de N nos grãos, todo o N necessário para o desenvolvimento da cultura poderá ser eficientemente fornecido pela simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (HUNGRIA et al., 2007), sendo tecnologia recomendada e amplamente adotada pelos sojicultores brasileiros.

Buscando novas alternativas para aumentar o rendimento de grãos, a Embrapa em conjunto com a Universidade Federal do Paraná (UFPR) lançaram 18 ensaios a campo, atendendo as exigências do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para comprovar a eficiência das estirpes, sendo destas, as mais utilizadas atualmente para produção industrial de inoculantes à base de *A. brasilense* no Brasil as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, em conjunto, que se mostraram eficientes para as culturas de milho (entre 24 e 30% de aumento de rendimento) e trigo (entre 13 e 18% de incremento) (HUNGRIA, 2011). A variabilidade das respostas no campo se deve à interação entre as plantas, bactérias e ambiente, envolvendo o manejo (ex: fertilização, cobertura do solo, etc.) e o tipo de solo (DIAZ-ZORITA & FERNANDEZ CANIGIA, 2008).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) correspondem a um grupo de micro-organismos benéficos às plantas devido à capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas (DAVISON, 1988; KLOEPPER et al., 1989). As BPCP podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio (HUERGO et al., 2008); aumento na atividade da redutase do nitrato, quando crescem endofiticamente nas plantas

(CASSÁN et al., 2008); produção de fitormônios como auxinas, citocininas (TIEN et al., 1979), giberelinas (BOTTINI et al., 1989), etileno (STRZELCZYK et al., 1994) e uma variedade de outras moléculas (PERRIG et al., 2007); solubilização de fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004); e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (CORREA et al., 2008). Em geral, acredita-se que as BPCP beneficiam o crescimento das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (Dobbelaere et al., 2003).

De acordo com Eckert et al. (2001), *Azospirillum* spp são bactérias gram-negativas, móveis e de várias origens geográficas. A temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41°C, dependendo da espécie. Bactérias deste gênero abrangem um grupo de BPCP de vida livre que é encontrado em quase todos os lugares da terra; há relatos, também, de que as bactérias desse gênero podem ser endofíticas facultativas (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000; HUERGO et al., 2008). Ganharam grande destaque mundialmente a partir da década de 1970 (DÖBEREINER & DAY, 1976; DÖBEREINER et al., 1976), com a descoberta da capacidade de FBN dessas bactérias quando em associação com gramíneas, como milho, trigo, sorgo e arroz.

Mas, ao contrário das bactérias simbióticas, bactérias associativas excretam somente uma parte do N fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para o sistema. Contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas. Desse modo, deve-se lembrar que, ao contrário das leguminosas, a inoculação de não-leguminosas com bactérias endofíticas ou associativas, ainda que essas consigam fixar N, ainda não é possível suprir totalmente as necessidades das plantas por N (HUNGRIA, 2011).

Alguns micro-organismos são capazes de degradar compostos poluentes, frequentemente auxiliam a rizoremediação produzindo hormônios, fixando N atmosférico, solubilizando P ou secretando sideróforos (DENTON, 2007). Da mesma forma, os consórcios de micro-organismos (também chamada coinoculação) são eficientes, já que cada parceiro pode realizar diferentes partes da rota de degradação catabólica (RAHMAN et al., 2002). Quando as plantas são expostas a condições de estresse, elas respondem aumentando os níveis de etileno, o que leva ao aumento da lesão celular e da planta (ARGUESO et al., 2007). Este aumento na

concentração de etileno pode ser prejudicial para o desenvolvimento das culturas, pois induz a desfolha e outros processos celulares deletérios (DESBROSSES et al., 2009).

Muitos dos micro-organismos promotores do crescimento vegetal destroem o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), precursor do etileno, através da produção da enzima ACC desaminase, diminuindo os níveis de etileno das plantas. Além disso, várias formas de estresse são aliviadas pelos micro-organismos produtores de desaminase ACC, tais como efeito dos micro-organismos fito-patogênicos, resistência ao estresse a hidrocarbonetos poliaromáticos, salinidade e seca (GLICK et al., 2007).

Os micro-organismos promotores podem atuar indiretamente no crescimento vegetal utilizando alguns mecanismos de biocontrole, como antagonismo, parasitismo, indução de resposta sistêmica, bloqueio de sinais químicos e competição.

Espécies dos gêneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Streptomyces*; e os gêneros fúngicos *Ampelomyces*, *Coniothyrium* e *Trichoderma* são micro-organismos bem estudados com comprovado favorecimento fitossanitário. Entre 1 e 35% dos isolados microbianos associativos estudados apresentaram capacidade antagonista, ou seja, inibiram o crescimento de micro-organismos patogênicos *in vitro* (BERG, 2009). Os mecanismos responsáveis pela atividade antagonista incluem a inibição por antibióticos, toxinas e ativadores de superfície (biossurfactantes), competição por minerais, nutrientes, locais de colonização; além de um mecanismo que desenvolve a produção de enzimas de degradação de parede celular (HARMAN, 2011).

Outro mecanismo que ajuda na promoção do crescimento das plantas é a resposta sistêmica que pode ser induzida (RSI) ou adquirida (RSA). A resposta sistêmica induzida é o fenômeno no qual a interação de alguns micro-organismos com a raiz da planta resulta em resistência das plantas a bactérias, vírus e fungos patogênicos (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009). Em contraste, resposta sistêmica adquirida é tipicamente ativada por micro-organismos patogênicos necróticos e a molécula que desempenha papel chave é o ácido salicílico. No entanto, tanto os efeitos da resposta sistêmica induzida quanto os efeitos da resposta sistêmica adquirida podem sobrepor-se em alguns casos, onde ambos os mecanismos

promovem a sanidade vegetal e favorecem o crescimento das plantas (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Os micro-organismos patogênicos regulam sua população através de sinais que regulam a sua expressão genética, alterando sua virulência e patogenicidade. As plantas e alguns dos micro-organismos benéficos são capazes de produzir moléculas que interferem especificamente nestes sinais, inibindo ou potencializando tal expressão genética dos patógenos, ou indiretamente através de alterações fisiológicas nas plantas (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Foi demonstrado que alguns micro-organismos promotores do crescimento vegetal são fortes competidores, crescem rapidamente e ocupam o ambiente onde estão, privando o patógeno de nutrição, água, competindo por sítios de infecção, espaço, resultando assim num maior rendimento da cultura (LOBO JÚNIOR et al., 2009).

A capacidade de isolados de diferentes espécies de *Trichoderma* em produzir ácido indolacético (AIA) foi comprovada, ocasionando maior desenvolvimento de raízes e parte aérea em plântulas de *Eucalyptus urophilla* e híbridos G-100 (*Eucalyptus grandis* x *E. urophilla*) (CARVALHO FILHO, 2008). Em sementes de tomateiro, foi observado acréscimo de AIA e GA₃ em plantas tratadas com *T. harzianum*. Além da adição destes fitormônios, o crescimento de raízes é responsável por uma parcela extra, após o aporte inicial, e também decréscimo da produção de etileno, devido à colonização das raízes. Os resultados encontrados indicam aumento do crescimento de raízes, estatura de planta, área foliar, massa fresca de brotos e raízes com aplicação do *T. harzianum* OTPB3 (CHOWDAPPA et al., 2013).

Tipicamente, os fungos penetram nas camadas exteriores da epiderme e córtex da planta, e estabelecem a comunicação química com a planta. Um resultado inicial é que os fungos são barrados pela planta, mas não mortos. Um número relativamente grande de sinais químicos (elicitores), liberados pelos fungos, estão presentes; incluindo pequenas proteínas, peptídeos e outros metabólitos, incluindo alguns voláteis (LORITO et al., 2010; SHORESH et al., 2010).

Uma expressiva gama de fungos de solo tem mostrado capacidade de solubilizar fosfatos, dos quais se destacam cepas de *Aspergillus niger* e de *Penicillium* spp. Dentre as várias espécies com capacidade de solubilização de minerais com fosfatos, em uma análise comparativa de cerca de 800 isolados desenvolvidos na

Austrália, foi identificado que o *P. bilaiae* mostra a maior atividade (WAKELIN et al., 2004).

As espécies de *Penicillium* spp. destacam-se por sua atividade na decomposição saprófito oportunista de materiais orgânicos (ex: folhas, raízes e cobertura vegetal), com papel relevante em processos de ciclagem de nutriente (carbono, nitrogênio, fósforo, etc.), melhoria na fertilidade dos ecossistemas e na mobilização de materiais orgânicos. Estes reduzem o pH nos micro sítios de atividade fúngica e também atuam como agentes complexantes de cátions que dissolvem minerais e precipitados inorgânicos, ou liberam minerais e nutrientes na solução de solo por quelação (STERFLINGER et al., 2000; SOUCHIE et al 2010).

As espécies de *Penicillium*, além de caracterizarem-se por sua abundante produção de antibióticos, ainda liberam vários metabólitos secundários que, no caso do *P. bilaiae*, são os ácidos oxálicos e cítricos. A liberação deste último é maior em condições limitadas de N, enquanto a produção de ácido oxálico é promovida pela limitação da disponibilidade de carbono. Citrato, oxalato, malato, malonato e succinato podem também ser quelantes e, desta maneira, cepas de *P. bilaiae* podem melhorar a solubilização de formas relativamente insolúveis de Fe, Cu e Zn (CUNNINGHAM & KUIACK, 1992).

Na condução de 47 estudos em cultivos de trigo no Canadá, observou-se que, em quase 50% dos ensaios com respostas à fertilização de P, a inoculação com *P. bilaiae* incrementou rendimento aos cultivos. As respostas não puderam ser relacionadas diretamente com a concentração de P extraível do solo, com os conteúdos da matéria orgânica ou textura dos solos, nem a padrões ou condições climáticas, e foram considerados como eventos ao acaso (KARAMANOS et al., 2010). Ao investigar outros possíveis mecanismos de promoção de crescimento, Anstis (2004) descreveu a produção *in-vitro* de precursores de hormônios vegetais que estimulariam a ramificação de raízes e, assim, contribuiriam para o crescimento das plantas (PATTEN & GLICK, 2002). Resultados similares de incrementos na produção de pêlos radiculares, em plantas de ervilha (*Pisum sativum*), foram descritos em resposta à inoculação com cepas de *P. bilaiae* (GULDEN & VESSEY, 2000).

3 REFERÊNCIAS

- ANSTIS S. T.. *Penicillium radicum*: Studies on the mechanisms of growth promotion in wheat. **Tese de doutorado**, School of Earth and Environmental Sciences, University of Adelaide, Australia. 2004.
- ARGUESO C.T.; HANSEN M.; KIEBER J.. Regulation of ethylene biosynthesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, n. 26, p. 92–105, 2007.
- BERG G.. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 84, p. 11–18, 2009.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.
- CARVALHO FILHO, M. R.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P.; MENÊZES, J. E. Avaliação de Isolados de *Trichoderma* na Promoção de Crescimento, Produção de Ácido Indolacético *in vitro* e Colonização Endofítica de Mudas de Eucalipto. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 226. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. ISSN 1676-340
- CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.61-86.
- CHOWDAPPA, P.; MOHAN KUMAR, S.P.; JYOTHI LAKSHMI, M.; UPRETI, K.K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control** v. 65, p. 109–117, 2013.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Décimo Primeiro Levantamento - Safra 2016/17**, v. 4, n. 11, p. 115-119, agosto 2017. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 19 ago 2017.
- CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.87-95.
- CUNNINGHAM, J & KUIACK, C. Production of Citric and Oxalic Acids and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58, p. 1451-1458, 1992.
- DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/Technology**, v.6, p.282- 286, 1988.

DENTON B. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. MMG 445 **Basic Biotechnology**, n. 3, p. 1–5, 2007.

DESBROSSES G.; CONTESTO C.; VAROQUAUX F.; GALLAND M.; TOURAINE B.. PGPR–*Arabidopsis* interactions is a useful system to study signalling pathways involved in plant developmental control. **Plant Signal Behavior**, n.4, p. 321–323, 2009.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.155-166, 2008.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.T. (Ed.) **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION**, vol. 2. **Proceedings...** Pullman, USA: Washington State University Press, 1976. p.518-538.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.1464–1473, 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Science Tech, Springer Verlag, Madison, USA, 1987. p. 1-155. (Brock/Springer series in contemporary bioscience)

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFLES, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, pt. 1, p. 17-26, 2001.

FIGUEROLA, E. L. M., GUERRERO, L. D., TÜRKOWSKY, D., WALL, L. G., AND ERIJMAN, L.. Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. **Environmental Microbiology**, 2014, doi:10.1111/1462-2920.12497,.

GULDEN, R. H. & VESSEY, J.K. *Penicillium bilaii* inoculation increases root-hair production in field pea. **Canadian Journal of Plant Science**. v. 80, p. 801-804, 2000.

GLICK B.R.; CHENG Z.; CZARNY J.; DUAN J.. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, n. 119, p. 329–339, 2007.

GLICK B.R.. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, n. 2012, p. 1–15, 2012. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.

HARMAN, G. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**. 189, 3, 647-649, Feb. 1, 2011. ISSN: 0028646X.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008. p.17-35.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283).

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Embrapa Soja. Documentos, 325). (ISSN 1516-781X; N 325).

KARAMANOS, R. E.; FLORE N. A. & HARAPIAK, J. T. Re-visiting Use of *Penicillium bilaii* with phosphorus fertilization of hard red spring wheat. **Canadian Journal of Plant Science**. v. 90, p. 265-277, 2010.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**. v.7, p.39-43, 1989.

LOBO JUNIOR, M.; BRANDÃO, R. S.; GERALDINE, A. M.. Produtividade do Feijoeiro Comum, em Campo, em Tratamentos com *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*. **Comunicado técnico 184**, 2009. ISSN 1678-961X

LORITO, M.; WOO, S. I.; HARMAN, G. E.; MONTE, E.. Translational Research on *Trichoderma*: **Field Annual Review of Phytopathology**. v. 48, p. 395-417, 2010.

LUGTENBERG B.; KAMILOVA F.. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Reviews Microbiology**, n. 63, p. 541–556, 2009.

MURRAY J.D.. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular Plant Microbe Interaction*, n. 24, p. 631–639, 2011.

PATTEN, C. L. & GLICK, B. R.. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied Environmental Microbiology**. v. 68, p. 3795-3801, 2002.

PEREG, L. & MCMILLAN, M.. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biology and Biochemistry**. n. 80, p. 349–358, 2015.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R.A.; DEL CERRO, P.; ESPUNY, M.R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; OLLERO, F.J.; CUBO. T.. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important

plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research** n. 169, p. 325–336, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

RAHMAN K.S.; RAHMAN T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY P.; BANAT I.M.. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. **Journal of Basic Microbiology**, n. 42, p. 284–291, 2002.

REEVE, J., SCHADT, C., CARPENTER-BOGGS, L., KANG, S., ZHOU, J., AND REGANOLD, J. P.. Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. **International Society for Microbial Ecology Journal**, n. 4, p. 1099–1107, 2010.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.

SHORESH, M., MASTOURI, F., HARMAN, G. E. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**. v.48, p. 21–43, 2010.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SILVA E. M. R.; SAGGIN-JÚNIOR, O. G.. Enhancement of clover growth by inoculation of P-solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizal fungi. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p.771-777, 2010. Trabalho apresentado na Academia Brasileira de Ciências. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652010000300023>>.

SPAEPEN S.; VANDERLEYDEN J.; REMANS R.; Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 31, p. 425–448, 2007.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a freeliving nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Chichester, v. 24, n. 4, p. 487-506, 2000.

STERFLINGER, K.. Fungi as geologic agents. **Geomicrobiology Journal**. v. 17, p. 97-124, 2000.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v.149, p.55-60, 1994.

SWARNALAKSHMI K., PRASANNA R., KUMAR A., PATTNAIK S., CHAKRAVARTY K., SHIVAY Y.S.. Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. **European Journal of Soil Biology**, n.55, p. 107–116, 2013.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

VERMA JP, YADAV J, TIWARI KN, LAVAKUSH, SINGH V.. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. **International Journal of Agriculture Researche**, n. 5, p. 954–983, 2010.

WAKELIN, S. A.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R.; RYDER, M. H.. Phosphate solubilisation by *Penicillium* species closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**. v. 40, p. 36-43, 2004.

4 CAPÍTULO I – CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE SOJA EM CÂMARA DE CRESCIMENTO E CASA DE VEGETAÇÃO, COINOCULADAS COM MICRO-ORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO

Micro-organismos aplicados como inoculantes podem ser usados em diversas culturas agrícolas, porém, seus efeitos e benefícios variam para cada espécie vegetal. O *Bradyrhizobium* spp pode fornecer todo o N necessário para o cultivo de soja através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Outras bactérias e fungos aplicados em conjunto (coinoculados) podem promover o crescimento de plantas através de diferentes mecanismos fisiológicos, proporcionando ganhos agrônômicos importantes para o cultivo. Com este trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da coinoculação de diferentes micro-organismos em sementes de soja e determinar as respostas dos tratamentos em estádios vegetativos V3 e V7, visando seu potencial uso como coinoculante. Foram implantados dois experimentos: um em câmara de crescimento em Quatro Barras/PR, com os seguintes tratamentos T1) controle sem tratamento químico ou inoculante biológico (CSQB); T2) controle com tratamento químico e sem biológico (CCQSB); T3) *B. japonicum* (Bj); T4) *A. brasilense* AbV5 e 6 (Ab); T5) *A. brasilense* Az39 (Az); T6) *T. virens* (Tv); T7) *T. asperellum* (Ta); T8) *P. bilaiae* (Pb) e T9) *T. virens* e *B. amyloquefaciens* (TvBa). E outro em casa de vegetação, instalado no Setor de Ciências Agrárias da UFPR, em Curitiba/PR, onde foram testados os tratamentos: T1) Bj; T2) Ab; T3) Ta; T4) TvBa e T5) Pb. Avaliou-se o comprimento da raiz principal, número de nódulos na raiz principal, número de nódulos nas raízes secundárias, nódulos totais, massa seca de raízes. As raízes foram submetidas às análises do programa WinRhizo® versão Pro 2013e (REGENT INSTRUMENT, 2013). Os experimentos foram instalados em arranjo delineamento inteiramente casualizado, a homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de Bartlett e as médias submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste SNK ($p \leq 0,05$) com o R (THE R CORE TEAM, 2016). Em câmara de crescimento as plantas de soja inoculadas com *P. bilaiae*, apresentaram aumento no número de nódulos nas raízes. A coinoculação com *A. brasilense* AbV05 e 06, e Az 39 e *P. bilaiae*, proporciona maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas, quando cultivadas em ambiente controlado. Na coinoculação em casa de vegetação com substrato terra, os tratamentos *T. asperellum* e *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* proporcionaram maior desenvolvimento do sistema radicular. A resposta das plantas aos micro-organismos difere de acordo com o ambiente estudado, e indicam potencial uso destes micro-organismos em coinoculação na cultura da soja.

Palavras-chave: *Glycine max*, inoculação, coinoculação, produto biológico.

INITIAL GROWTH OF SOYBEAN PLANTS AT GROWTH CHAMBER AND GREENHOUSE, COINOCULATED WITH PLANT GROWTH PROMOTERS MICRORGANISMS

ABSTRACT

Microorganisms applied as inoculants can be used in several crops, but their effects and benefits vary for each plant species. *Bradyrhizobium* spp can provide all the N necessary for soybean crop through biological nitrogen fixation (BNF). Other bacteria and fungi applied together (co-inoculated) can promote plants growth through different physiological mechanisms, providing important agronomic gains. The objective of this study was to evaluate the effect of the co-inoculation of different microorganisms on soybean seeds and determine the responses of the treatments in vegetative stages V3 e V7, aiming their potential use as co-inoculants. Two experiments were carried out, one in a growth chamber in Quatro Barras - PR, and were tested T1). Control treatment without chemical or biological inoculant (CSQB); T2) Control with chemical treatment and without biological (CCQSB); T3) *B. japonicum* (Bj); T4) *A. brasilense* AbV5 and 6 (Ab); T5) *A. brasilense* Az39 (Az); *T. virens* (Tv); T7) *T. asperellum* (Ta); T8) *P. bilaiae* (Pb) and T9) *T. virens* and *B. amyloquefaciens* (Tv and Ba). And another trial in a greenhouse, installed in the Agricultural Sciences Sector - UFPR, in Curitiba, PR, where tested treatments were: T1) Bj; T2) Ab; T3) Ta; T4) Tv and Ba and T5) Pb. It was evaluated main root length - CRP (cm), nodules number in main root - NRP, nodules number in secondary roots - NRS, total nodules - NT and root dry matter - MSR (g). The roots were submitted to WinRhizo® version Pro 2013e (REGENT INSTRUMENT, 2013) analyzes. The experiments were installed in a completely randomized design, the variances homogeneity was confirmed by Bartlett test, the means were submitted to analysis of variance and compared by SNK ($p \leq 0.05$) test using R Program (THE CORE TEAM, 2016). In a growth chamber, soybean plants inoculated with *P. bilaiae* showed an increase of roots number of nodules. The co-inoculation with *A. brasilense* AbV05 and 06, and Az 39 and *P. bilaiae*, provides greater development of plants root system, when cultivated in a controlled environment. In the greenhouse co-inoculation with land substrate, treatments *T. asperellum* and *T. virens* and *B. amyloliquefaciens* provided greater development of the root system. The responses of the plants to microorganism's application differs according to studied environment, and indicate the potential use of these microorganisms in co-inoculation in the soybean crop.

Key-words: *Glycine max*, inoculation, co-inoculation, biological product.

4.1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é cultivada em aproximadamente 33,9 milhões de hectares no Brasil, com rendimento médio de 3.362 kg.ha⁻¹, sendo que, no Paraná, abrange cerca de 5,25 milhões de hectares, com rendimento médio de 3.721 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2017).

O fornecimento de fertilizantes nitrogenados possui baixa eficiência de utilização pela planta, devido às perdas por lixiviação e volatilização. No caso da soja, que exporta 80 kg N.T⁻¹ de grãos, a adição de micro-organismos benéficos (inoculação) é uma técnica importante para o cultivo. O *Bradyrhizobium* spp. captura o N₂ do ar presente no solo, que é reduzido a amônia dentro dos nódulos das raízes e possibilita que este mineral seja absorvido e utilizado pelas plantas de soja, e todo o N necessário para o desenvolvimento da cultura é fornecido eficientemente através desta simbiose com bactérias do mesmo gênero (HUNGRIA et al., 1994).

Além da inoculação com *Bradyrhizobium* spp., alternativas vêm sendo estudadas, dentre elas, a introdução e uso de outras espécies de micro-organismos e, ou grupo de produtos, usados isoladamente ou em conjunto (coinoculação).

O uso de inoculantes comerciais de espécies microbianas que beneficiam culturas de interesse agrônomo é comum e possui eficiência geralmente dependente de fatores como o tipo de substrato e o estágio de desenvolvimento vegetal no momento da inoculação (MWANGI et al., 2013; HUNGRIA et al., 2013). São diversos os mecanismos para favorecer o crescimento das plantas, como a produção de metabólitos benéficos como fitormônios, antibióticos ou sideróforos, solubilização de minerais e antagonismo a fitopatógenos (SOUCHIE et al., 2010; MARTINEZ-MEDINA et al., 2014; RÊGO et al., 2014). Sugere-se que, de acordo com a habilidade dos micro-organismos em promover o crescimento de plantas, estes poderiam ser divididos em dois grandes grupos: micro-organismos que promovem o crescimento de plantas através da ação fisiológica ou bioquímica direta, ou indiretamente através do biocontrole de patógenos ou competição (CASSAN et al., 2009).

Como resultado da melhoria destes processos fisiológicos, a inoculação busca gerar benefícios agrônômicos para a cultura, como o aumento do índice de germinação de sementes e da velocidade de emergência de plântulas (HERMOSA

et al., 2012), fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 1994), aumento da massa seca acumulada e rendimento (EL ZEMRANY et al., 2007; HUNGRIA et al., 2013; PRUDENT et al., 2015; MWANGI et al., 2013).

Novas alternativas estão sendo estudadas para aumentar o rendimento das culturas, dentre elas, a combinação de mais de um inoculante (coinoculação) mostrou-se promissora, gerando ganhos de até 11,3% em feijão quando coinoculado com *A. brasilense* (HUNGRIA et al., 2013). Não obstante, o aumento da eficiência de recursos como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro e zinco foi atribuído à coinoculação, havendo aporte destes minerais em soja coinoculada com *B. japonicum* e actinomicetos endofíticos (NIMNOI et al., 2014).

Alguns estudos buscam o potencial *in vitro* dos promotores de crescimento evidenciando seus mecanismos de ação (CASSÁN et al., 2009); outros buscam diretamente o efeito em rendimento, mas poucos estudos avaliam as respostas das plantas aos estímulos gerados pelos diferentes micro-organismos inoculados em soja, uniformizando fatores que interferem no desenvolvimento e na relação entre os promotores de crescimento e as plantas, tais como umidade, temperatura, luminosidade/radiação, matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes, volume de substrato explorado pelas raízes, micro-organismos presentes no substrato.

Como o uso de *Bradyrhizobium* em sementes de soja pode promover o crescimento das plantas, portanto, o seu uso em combinação com outros micro-organismos poderá proporcionar diferentes respostas nos componentes morfofisiológicos das plantas, podendo ser comprovado quando cultivado em ambientes controlados.

Com este trabalho objetivou-se avaliar o efeito da coinoculação de diferentes micro-organismos em sementes de soja e determinar as respostas dos tratamentos nos estádios vegetativos V3 e V7, visando identificar seus potenciais usos como coinoculantes.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram implantados dois experimentos com a cultura da soja. O primeiro em câmara de crescimento (CC), instalado na planta industrial da Novozymes BioAg Produtos para Agricultura, no município de Quatro Barras, Paraná, no dia 06 de

junho de 2014. As plantas (CV ST 820RR) foram cultivadas por 26 dias, até a colheita (02 de julho de 2014), quando as mesmas atingiram o estágio V3 (FARIAS et al., 2007).

Utilizou-se o delineamento em blocos inteiramente casualizados, com nove tratamentos: T1) controle sem tratamento químico ou inoculante biológico (CSQB); T2) controle com tratamento químico e sem biológico (CCQSB); T3) *Bradyrhizobium japonicum* semias 5079 e 5080 ($1,2 \times 10^6$ UFC semente⁻¹; Bj), sendo este tratamento a testemunha inoculada e, utilizada em comparação aos tratamentos coinoculados com *B. japonicum* semias 5079 e 5080 ($1,2 \times 10^6$ UFC semente⁻¹) e: T4) *Azospirillum brasilense* AbV5 e 6 (6×10^4 UFC semente⁻¹; Ab); T5) *Azospirillum brasilense* Az39 (16×10^4 UFC semente⁻¹; Az); T6) *Trichoderma virens* Gl-3 ($1,3 \times 10^6$ esporos viáveis semente⁻¹; Tv); T7) *Trichoderma asperellum* T211 ($2,1 \times 10^6$ esporos UFC semente⁻¹; Ta); T8) *Penicillium bilaiae* P201 e P208 ($2,7 \times 10^3$ UFC semente⁻¹; Pb) e T9) *Trichoderma virens* (Gl-3) e *Bacillus amyloquelaciens* TJ1000 (1×10^4 e $5,3 \times 10^4$ UFC semente⁻¹; TvBa; respectivamente). Os tratamentos T2 ao T9 também receberam dose de 1 mL.kg⁻¹ Fipronil (250 g.L⁻¹) e Piraclostrobina (25 g.L⁻¹) e Tiofanato metílico (225 g.L⁻¹).

A temperatura foi controlada em $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 14 horas diárias, fornecendo 6.000 lumens.m⁻². As parcelas experimentais foram compostas por copos plásticos perfurados no fundo, preenchidos com 300 mL areia lavada e autoclavada de granulometria média, homogeneizadas em proporção 1:3 (v/v) com substrato filtrante perlítico. Os copos furados permaneceram sobre uma bandeja plástica que recebeu a cada dois dias 500 mL de solução nutritiva de Hoagland sem N (HOAGLAND, 1950).

O segundo experimento, em casa de vegetação, foi conduzido no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Campus I, em Curitiba, Paraná. Na instalação deste ensaio, foram utilizados vasos cilíndricos, perfurados no fundo, de dimensões de 0,15m de altura, 0,20m de diâmetro e volume de 0,00471m³ preenchidos com aproximadamente 3,5 kg de terra esterilizada, autoclavada a 125 °C, por 40 minutos. A análise química deste substrato indicou pH 6,6 pelo método do SMP; teores de 0,0 para Al⁺³; 4,2 de Ca⁺²; 1,9 de Mg⁺²; 0,8 de K⁺; 6,9 de soma de bases e 10,1 de total de cargas, todos em cmol_c.dm⁻³; 19 mg.dm⁻³ de P; porcentagem de saturação ocupada por bases em 68% e relação Ca/Mg em 2,21.

Adubação foi com 04-14-08 na razão de 250 kg.ha⁻¹, isto é, 0,6 g do formulado NPK por vaso.

Semeou-se cinco sementes de soja (CV BMX Potência RR) em dois vasos por tratamento no dia 16 de novembro de 2014; cultivadas até 05 de janeiro de 2015, quando apresentavam estágio V7 (50 dias após o plantio). Todos os vasos receberam água até a capacidade de campo, a cada dois dias e a temperatura foi mantida a 23±3°C. As sementes receberam inseticida Imidacloprido (150 g.L⁻¹) e Tiodicarbe (450 g.L⁻¹), na dose de 5 mL.kg semente⁻¹ e fungicida Carbendazim (150 g.L⁻¹) e Tiram (350 g.L⁻¹), na dose de 2 mL.kg⁻¹. Os produtos biológicos dos tratamentos foram diluídos no protetor biológico ProActive, na dose de 1,4 mL.kg semente⁻¹. Em seguida, foi acrescentado o inoculante *B. japonicum* semias 5079 e 5080, de acordo com a dose recomendada pelo fabricante (1,2x10⁶ UFC semente⁻¹). A cada aplicação, as sementes foram agitadas em sacos plásticos inflados para completa homogeneização e secagem das sementes e produtos aplicados.

Os tratamentos testados foram: T1) *Bradyrhizobium japonicum* semias 5079 e 5080 (1,2x10⁶ UFC.semente⁻¹; B); T2) *Azospirillum brasilense* AbV5 e 6 (2,3x10⁴ UFC.semente⁻¹; Ab); T3) *Trichoderma asperellum* T211 (1,5x10⁶ esporos viáveis.semente⁻¹; Ta); T4) *Trichoderma virens* GI-3 e *Bacillus amyloquelaciens* - TJ1000 (1,4x10⁴ e 7,1x10⁴ UFC.semente⁻¹, TvBa; respectivamente) e T5) *Penicillium bilaiae* P201 e P208 (2,7x10³ UFC.semente⁻¹; Pb).

A amostragem realizada nos dois experimentos foi de plantas inteiras, sendo avaliadas quanto ao comprimento da raiz principal, número de nódulos na raiz principal (nódulos que compreendiam um gabarito retangular de 2,5 cm de largura por 5 cm de profundidade, a partir do colo da planta), número de nódulos nas raízes secundárias (nódulos externos ao gabarito), nódulos totais, massa seca de parte aérea (g) e massa seca de raízes (g). As raízes frescas foram armazenadas em solução alcoólica a 50% e, posteriormente, submetidas às análises do programa WinRhizo® versão Pro 2013e (REGENT INSTRUMENT, 2013).

A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de Bartlett e as médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste SNK (p≤0,05), com auxílio do programa R (THE R CORE TEAM, 2016).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Experimento em câmara de crescimento.

Os tratamentos T1 (CSQB) e T2 (CCQSB) não possibilitaram nodulação, servindo de controle negativo para o ensaio, a fim de testar os efeitos dos produtos aplicados de forma isolada.

Os tratamentos coinoculados (T4, T5, T6, T7, T8 e T9) não se diferenciaram do tratamento T3, com *B. japonicum*, para as variáveis nódulos totais e nódulos na raiz principal, indicando que a adição dos micro-organismos promotores do crescimento testados poderiam ser utilizados como inoculantes sem prejudicar a nodulação (Tabela 1). A coinoculação em sementes de soja com *B. japonicum* e *A. brasilense* já foi testada para as variáveis de nodulação e não houve diferença entre os tratamentos (HUNGRIA et al., 2013). A inoculação com *B. subtilis*, *Klebsiella planticola* e *Proteus vulgaris* foi testada individualmente e em combinação (coinoculação) com *B. japonicum* na soja e *Rhizobium leguminosarum* na lentilha (*Lens culinaris*), não sendo detectada diferença estatística para as variáveis número de nódulos, massa seca de nódulos e rendimento (TSIGIE et al., 2011). Entretanto, estudando a nodulação de raízes de alfafa, verificou-se que o efeito das diferentes combinações de micro-organismos (*Azospirillum*, *Rhizobium* e fungos micorrízicos) é superior em solos não esterilizados comparada à inoculação de algum destes micro-organismos promotores isolados. Isto indica que micro-organismos promotores de crescimento precisam ser bons colonizadores, para competir com colônias de micro-organismos já estabelecidas no substrato (BIRÓ et al., 2000).

O tratamento T8 (*P. bilaiae*) foi estatisticamente superior ao tratamento T5 (*A. brasilense* Az 39) indicando que poderia haver um efeito sinérgico entre alguns micro-organismos, cepas e suas combinações (WU et al., 2011). Embora a aplicação de *A. brasilense* tenha reduzido ligeiramente os valores de algumas variáveis, comparado ao tratamento com fungo micorrízico, o tratamento com ambos mais *Rhizobium* mostrou uma melhoria adicional (um efeito sinérgico), para quase todas as variáveis e substratos testados, inclusive para nodulação (BIRÓ et al; 2000). A aplicação de várias doses de *A. brasilense* coinoculado com *B. japonicum* pode interferir na nodulação, mas parece que tal efeito é dependente do ambiente (SOUZA & FERREIRA, 2017).

O comprimento da raiz principal foi superior nos tratamentos T2 (CCQSB), T4 (*A. brasilense*) e T9 (*P. bilaiae*) em relação ao T1 (CSQB), não havendo diferença entre os tratamentos inoculados. Isso pode indicar exploração de recursos como água e nutrientes em camadas mais profundas de solo, o que favoreceria o cultivo numa condição de estresse hídrico.

Tabela 1 - Número de nódulos totais (NT), número de nódulos da raiz principal (NRP), comprimento da raiz principal (CRP), massa seca de raízes (MSR), comprimento total de raízes (CTR), superfície específica (SE) e volume de raízes (V) por planta de soja, em câmara de crescimento (CC), no município de Quatro Barras. Curitiba, PR, 2017.

Trat.	NT	NRP	CRP (cm)	MSR (g)	CTR (cm)	SE (cm ²)	V (cm ³)
T1 - CSQB	0,0 c	0,0 c	22,2 b	0,172 ab	566,9 b	59,8 ab	0,51 ab
T2 - CCQSB	0,0 c	0,0 c	28,8 a	0,182 a	617,2 ab	67,2 ab	0,60 ab
T3 - Bj	12,4 ab	11,3 ab	26,9 ab	0,168 ab	609,4 ab	63,5 ab	0,55 ab
T4 - Ab	12,0 ab	8,7 b	28,7 a	0,164 abc	690,1 a	76,0 a	0,69 a
T5 - Az	10,7 b	7,0 b	27,2 ab	0,170 ab	677,0 ab	75,0 a	0,68 a
T6 - Tv	12,5 ab	7,5 b	23,1 ab	0,160 abc	605,5 ab	70,0 ab	0,66 ab
T7 - Ta	11,8 ab	8,8 b	28,1 ab	0,147 bc	636,5 ab	65,8 ab	0,56 ab
T8 - TvBa	13,0 a	8,6 b	27,8 ab	0,153 bc	639,1 ab	68,2 ab	0,59 ab
T9 - Pb	12,3 ab	8,7 b	28,7 a	0,157 abc	622,9 ab	59,0 ab	0,45 ab
CV (%)	11,2	23,2	12,7	9,2	10,4	10,4	23,8

Números seguidos de letras iguais, na mesma coluna, indicam que não há diferença estatística significativa, pelo teste de SNK (5%).

FONTE: BUSO (2017).

A massa seca de raízes foi superior apenas para o T2 (CCQSB), comparado aos tratamentos T7 (*T. asperellum*) e T8 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*). O fato do tratamento T2 (CCQSB) ter maior valor absoluto de massa seca de raízes se deve provavelmente à busca por nutrientes, especialmente o N, que não estava presente no sistema.

Os tratamentos inoculados com fungos (T6 - *T. virens*, T7 - *T. asperellum*, T8 - *T. virens* e *B. amyloliquefaciens*, e T9 - *P. bilaiae*), não apresentaram diferença, comparado ao tratamento controle inoculado (T3 - *B. japonicum*), avaliando-se massa seca de raízes. Os fungos utilizados nestes tratamentos, mesmo não sendo fitopatogênicos, são conhecidos por sua agressividade oligotrófica e, neste caso, as colônias de fungos podem ter competido com as plantas pelos limitados recursos disponíveis no substrato inerte e pobre (SILVA & MELLO, 2007; SILVA et al., 2010). Porém, este possível efeito danoso não ocorreu no presente trabalho.

Restaria como única fonte de N no substrato o nutriente fixado por *B. japonicum*, uma vez que o substrato utilizado era inerte e a solução nutritiva utilizada não possuía N na formulação. Por outro lado, os outros tratamentos estudados, com

as bactérias *A. brasilense* e *B. amyloliquefaciens*, possibilitaram valores iguais de massa seca de raízes. Tais bactérias já foram descritas como fixadoras de N, sendo este um dos principais mecanismos de promoção do crescimento destes micro-organismos (PORTUGAL et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2016), confirmando que estes micro-organismos conseguem promover o crescimento das plantas fazendo uso de diferentes mecanismos, que parecem ser compensatórios (SILVA & MELLO, 2007; HARMAN, 2011; FIGUEIREDO et al., 2016).

As variáveis comprimento, superfície específica e volume de raízes são dependentes, por isso, apresentam tendência semelhante (Tabela 1). O tratamento T4 (*A. brasilense*) foi superior apenas ao tratamento T1 (CSQB), não havendo diferença entre os outros tratamentos para comprimento de raízes. A coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* (AbV05/06) em soja e feijão, melhora o desenvolvimento do sistema radicular e o uso desta técnica vem sendo difundida no Brasil (HUNGRIA et al., 2013). Entretanto, a semia de *A. brasilense* (AZ39), coinoculada com *Bradyrhizobium* spp., promoveu o aumento da nodulação, mas não diferiu para comprimento de raízes, comparada ao tratamento inoculado apenas com *B. japonicum* semia E109 (CASSÁN et al., 2009). Segundo Dardanelli et al. (2008), o efeito da coinoculação de *Azospirillum* e *Rhizobium* foi maior desenvolvimento de raízes, fixação de nitrogênio, produção de moléculas sinais, entre outros parâmetros avaliados em feijão.

Ao analisar as variáveis comprimento e volume de raízes por classes de diâmetro (Tabela 2), observa-se que houve resposta para os tratamentos nas classes de diâmetros entre 1,5 e 2,0mm; 2,0 e 2,5mm; 2,5 e 3,0mm; 4,0 e 4,5mm e maior que 4,5mm. Essa resposta poderia estar relacionada ao estágio da planta em que os micro-organismos atuam, ou estágio no qual a planta responde aos estímulos recebidos.

As plantas de soja tiveram maiores comprimentos de raízes com menores diâmetros e, à medida que o diâmetro aumentou, houve redução na quantidade de raízes (comprimento). Os resultados de comprimento de raízes para os tratamentos estudados não apresentam mesma tendência nas diferentes classes de diâmetro avaliadas: o T3 (*B. japonicum*) proporcionou o menor comprimento de raízes de diâmetro entre 1,5 e 2,0mm, e o maior comprimento na faixa de raízes com mais de 4,5mm de diâmetro, comparado aos outros tratamentos. Não obstante, a redução do comprimento de raízes de uma determinada classe de diâmetro em favor do

aumento no comprimento de raízes de outra classe de diâmetro foi apontada em chicória, quando houve privação de adubação fosfatada (ZOBEL et al., 2007). Isso poderia indicar que, quando inoculado sozinho, o estímulo do *B. japonicum* ocorreu logo após a emissão das primeiras raízes, proporcionando aumento no diâmetro das raízes no colo da planta.

Tabela 2 - Comprimento (CR) e volume (V) para classes de diâmetro de raízes entre 1,5 e 2,0 mm, 2,0 e 2,5 mm, 2,5 e 3,0 mm, 4,0 e 4,5 mm e maiores que 4,5 mm, por plantas soja, em câmara de crescimento (CC), no município de Quatro Barras. Curitiba, PR, 2017.

Tratamentos		1,5<=2,0mm	2,0<=2,5mm	2,5<=3,0mm	4,0<=4,5mm	>4,5mm
CR (cm).planta ⁻¹	T1 - CSQB	3,5 a	2,1 ab	1,0 ab	0,1 b	0,1 b
	T2 - CCQSB	3,4 a	2,3 ab	1,3 ab	0,2 ab	0,3 b
	T3 - Bj	2,1 b	1,6 ab	0,8 ab	0,2 ab	0,7 a
	T4 - Ab	4,1 a	2,3 ab	1,3 a	0,1 b	0,1 b
	T5 - Az	3,6 a	2,4 ab	1,3 a	0,3 a	0,3 b
	T6 - Tv	3,5 a	2,5 ab	1,0 ab	0,1 b	0,1 b
	T7 - Ta	3,3 a	2,0 ab	1,0 ab	0,2 ab	0,1 b
	T8 - TvBa	3,4 a	2,5 a	0,8 ab	0,2 ab	0,2 b
	T9 - Pb	3,3 a	1,7 ab	0,8 ab	0,1 b	0,1 b
CV(%)		17,2	24,0	37,6	59,9	68,4
V (cm ³).planta ⁻¹	T1 - CSQB	0,08 a	0,08 ab	0,06 ab	0,02	0,02 b
	T2 - CCQSB	0,08 a	0,09 ab	0,07 ab	0,03	0,06 b
	T3 - Bj	0,05 b	0,07 ab	0,05 ab	0,03	0,17 a
	T4 - Ab	0,10 a	0,09 ab	0,08 a	0,02	0,03 b
	T5 - Az	0,08 a	0,10 ab	0,08 a	0,04	0,07 b
	T6 - Tv	0,08 a	0,10 ab	0,06 ab	0,02	0,02 b
	T7 - Ta	0,08 a	0,08 ab	0,06 ab	0,03	0,03 b
	T8 - TvBa	0,08 a	0,10 a	0,05 ab	0,03	0,05 b
	T9 - Pb	0,08 a	0,07 ab	0,05 ab	0,01	0,02 b
CV (%)		18,2	24,3	37,8	73,3	74,5

Números seguidos de letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística significativa, pelo teste de SNK (5%).

FONTE: BUSO (2017).

Observou-se diferença no comprimento de raízes de mesma classe de diâmetro, em um estudo de escassez de N, P e K, onde a tendência de resposta para as demais classes de diâmetro foi similar (MANDAL et al., 2014), divergindo do presente estudo, onde não houve tal tendência. Da mesma forma, alterações no diâmetro de raízes de leguminosas foram atribuídas a diferentes concentrações de nutrientes por Zobel et al (2007). Houve benefícios provenientes da inoculação de *A. lipoferum* em sementes de milho, conduzido em casa de vegetação, avaliado aos 26, 30 e 35 dias após o plantio para massa seca, comprimento, superfície específica e número de pontas, comparado ao controle, mas não houve diferença para diâmetro médio de raízes (EL ZEMRANY et al., 2007). Isto talvez por característica

morfológica do seu sistema radicular, que não apresenta câmbio e crescimento radial, diferente da soja.

O fato dos resultados dos tratamentos não se repetirem nas classes de diâmetro, poderia indicar que o estímulo dos micro-organismos estudados ocorre com mais intensidade em algumas das fases de crescimento da planta, provavelmente fases iniciais e, assim, os mecanismos de promoção de crescimento, como: solubilização de minerais, aumento da eficiência de uso dos recursos disponíveis e produção de fitormônios poderiam atuar aumentando o diâmetro apenas de determinadas classes de raízes, e não outras. Confirmada esta hipótese, o diâmetro seria uma variável importante para o entendimento das respostas das plantas aos estímulos dos micro-organismos promotores do crescimento vegetal.

4.3.2 Experimento em casa de vegetação.

Ao analisar o experimento conduzido em casa de vegetação por 50 dias, verificou-se que os efeitos dos tratamentos foram observados em menor número de variáveis. Foram encontrados apenas efeitos dos tratamentos nas variáveis massa seca de raízes e, para raízes de diâmetro maior que 3,5 mm e menor ou igual a 4,0 mm, comprimento, área projetada, superfície específica e volume (Tabela 3).

Considerando a variável massa seca de raízes, observa-se que o tratamento T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) foi superior ao tratamento T2 (*A. brasilense*), não havendo diferença entre os outros tratamentos estudados. Neste sentido, Prudent et al. (2015), avaliando plantas de soja, detectaram respostas positivas com a coinoculação de *B. japonicum* e thuricin-17, um estimulante de crescimento produzido por *B. thuringiensis*, para variáveis fisiológicas e morfológicas, como massa seca, comprimento e diâmetro de raízes, além de número e massa seca de nódulos. Além do efeito de expansão do sistema radicular, estimulado por esses micro-organismos, a combinação de *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* favorece interações das raízes das plantas com fungos micorrízicos nos solos, o que pode aumentar ainda mais o crescimento das raízes (PARNELL et al., 2016; THONAR et al., 2017).

Tabela 3 - Massa seca de raízes (MSR) considerando todos os diâmetros; e comprimento (CR), área projetada (AP), superfície específica (SE) e volume (V) para raízes de diâmetro maior que 3,5 mm e menor ou igual a 4,0 mm, por planta de soja, em casa de vegetação (CVeg), no Setor de Ciências Agrárias, UFPR, Curitiba, PR. Curitiba, PR, 2017.

Tratamentos	MSR (g)	CR (cm)	AP (cm ²)	SE (cm ²)	V (cm ³)
		3,5<4,0mm	3,5<4,0mm	3,5<4,0mm	3,5<4,0mm
T1 – Bj	0,15 ab	0,89 ab	0,33 abc	1,05 bc	0,10 bc
T2 – Ab	0,12 b	0,88 ab	0,33 bc	1,02 bc	0,09 bc
T3 – Ta	0,16 ab	1,13 a	0,43 a	1,35 a	0,13 a
T4 – TvBa	0,18 a	1,13 a	0,42 ab	1,30 ab	0,12 ab
T5 – Pb	0,14 ab	0,71 b	0,27 c	0,83 c	0,08 c
CV (%)	18,9	19,5	15,8	15,4	15,8

Números seguidos de letras iguais, na mesma coluna, indicam que não há diferença estatística significativa, pelo teste de SNK (5%).

FONTE: BUSO (2017).

Os tratamentos T3 (*T. asperellum*) e T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) foram superiores ao tratamento T5 (*P. bilaiae*) para a variável comprimento de raízes. Ao promoverem maior crescimento de raízes, os fungos do gênero *Trichoderma* poderiam aumentar a absorção de água e nutrientes, se aplicados em condições de cultivo a campo, melhorando o crescimento, desenvolvimento e rendimento das plantas cultivadas (PARNELL et al., 2016; THONAR et al., 2017). Neste sentido, a aplicação de *T. virens* melhorou a taxa de germinação e crescimento de plântulas, apresentando a mesma resposta para as variáveis comprimento e massa seca de raízes, bem como absorção de ferro (Fe) (ENTESARI et al., 2013). Além do estímulo de crescimento, a sanidade das raízes pode ser um efeito importante da aplicação de *T. asperellum*, especialmente em condições de maior atividade de fungos fitopatogênicos de solo, havendo sinergia entre a sanidade e promoção do crescimento radicular (LOBO JUNIOR et al., 2009).

A análise estatística revelou ainda que o tratamento T3 (*T. asperellum*) foi superior aos tratamentos T2 (*A. brasilense*) e T5 (*P. bilaiae*), sendo o tratamento T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) superior apenas ao tratamento T5 (*P. bilaiae*) para a variável área projetada. Observando-se as variáveis superfície específica e volume de raízes o tratamento T3 (*T. asperellum*) foi superior aos tratamentos T1 (*B. japonicum*), T2 (*A. brasilense*) e T5 (*P. bilaiae*), e o tratamento T4 (*T. asperellum*) superior apenas ao T5 (*P. bilaiae*).

O uso de *Trichoderma* spp. proporcionou aumento de massa seca de raízes em mudas clonais de eucalipto, apresentando comportamento endofítico e podendo

indicar alguma relação mutualística com plantas, além da conhecida atividade biocontroladora (CARVALHO FILHO et al., 2008). Parece razoável sugerir que os tratamentos com a aplicação deste gênero de indivíduos tenham apresentado tais resultados para área projetada, superfície específica e volume de raízes, aliado à produção de AIA, produção de outros metabólitos ainda não identificados, atividade biocontroladora e solubilização de nutrientes para estimular o crescimento de raízes (HARMAN, 2011; ENTERESARI et al., 2013).

4.4 CONCLUSÕES

Em câmara de crescimento as plantas de soja inoculadas com *P. bilaiae*, apresentaram aumento no número de nódulos nas raízes. A coinoculação com *A. brasilense* AbV05 e 06, e Az 39 e *P. bilaiae*, proporciona maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas, quando cultivadas em ambiente controlado.

Na coinoculação em casa de vegetação com substrato terra, os tratamentos *T. asperellum* e *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* proporcionaram maior desenvolvimento do sistema radicular.

A resposta das plantas aos micro-organismos difere de acordo com o ambiente estudado, e indicam potencial uso destes micro-organismos em coinoculação na cultura da soja.

4.5 REFERÊNCIAS

- BIRÓ, B.; KÖVES-PÉCHY, K.; VÖRÖS, I.; TAKÁCS, T.; EGGENBERGER, P.; STRASSER, R.J.. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 159–168, 2000.
- CARVALHO FILHO, M.R.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P.; MENÊZES, J. E.. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 226, EMBRAPA 2008. ISSN 1676-340.
- CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V.. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**. v. 45, p. 28 – 35, 2009. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Décimo Primeiro Levantamento - Safra 2016/17**, v. 4, n. 11, p.115-119, agosto 2017. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 19 ago 2017.
- DARDANELLI, M. S.; CORDOBA, F. J. F.; ESPUNY, M. R.; CARVAJAL, M. A. R.; DIAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y.; MEGIAS, M.. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress **Soil Biology and Biochemistry**. v. 40, p. 2713–2721, 2008. doi:10.1016/j.soilbio.2008.06.016
- EL ZEMRANY, H., CZARNES, S., HALLETT, P.D. et al. Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. **Plant and Soil**. v. 291, p. 109-118, 2007. doi:10.1007/s11104-006-9178-0
- ENTESARI, M.; SHARIFZADEH, F.; AHMADZADEH, M.; FARHANGFAR, M.. Seed Biopriming with *Trichoderma* Species and *Pseudomonas fluorescent* on Growth Parameters, Enzymes Activity and Nutritional Status of Soybean. **International Journal of Agronomic Plant Production**. v. 4, p. 610-619, 2013.
- FARIAS, J. R. B., NEPOMUCENO, A. L., NEUMAIER, N.. Fisiologia da soja. **Circular Técnica** 48. Embrapa Soja, Londrina – PR, 2007. ISSN 1516-7860.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C.; ARAUJO, F. F.; STAMFORD, N. P. Beneficial Microorganisms: Current Challenge to Increase Crop Performance. In: Arora, N.K., et al. (eds.), **Bioformulations: for Sustainable Agriculture**, p 54 – 65, 2016. Springer India DOI 10.1007/978-81-322-2779-3_3
- HARMAN, G. E..Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**. v. 189, p. 647-649, 2011, ISSN: 0028646X.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E.. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p.17-25, 2012. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/>>. Acesso em: 22 abr. 2016. doi: 10.1099/mic.0.052274-0.

HOAGLAND D.R., ARNON D.Y. **The water culture method for growing plants without soil**, California Agricultural Experimental Station, University of California - Berkeley. Circ 347, 1950.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R.. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Micro-organismos de importância agrícola**, Brasília: Embrapa - SPI., p.9-89. 1994.

HUNGRIA, M. NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R.S.. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p791-801, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00374-012-0771-5>>. Acesso em: 22 abr. 2016. doi: 10.1007/s00374-012-0771-5.

LOBO JUNIOR, M.; BRANDÃO, R. S.; GERALDINE, A. M.. Produtividade do Feijoeiro Comum, em Campo, em Tratamentos com *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*. **Comunicado técnico 184**, 2009. ISSN 1678-961X

MANDAL, K.G.; WANRONG, G.; CAI, Z. M.; DUAN, L.; LI, Z.. Effect of nutrient- N, P and K starvation on root growth of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seedlings **Ecology, Environment and Conservation**. v. 20, p. 459-466, 2014.

MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ALGUACIL, M. D. M.; PASCUAL, J. A.; WEES, S. C. M. V.. phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, p.804-815, 2014. DOI: 10.1007/s10886-014-0478-1.

MWANGI, A. M. K.; KAHANGI, E. M.; ATEKA, E.; ONGUSO, J.; MUKHONGO, R. W.; MWANGI, E. K.; JEFWA, J. M.. Growth effect of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p.152-162, 2013. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/apsoil>. Acesso em: 22 abr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.002>.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S.. Coinoculation of soybean (*Glycine max*) with *Actinomyces* and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, p. 432-446, 2014. DOI: 10.1080/01904167.2013.864308

PARNELL, J. J.; BERKA, R.; YOUNG, H. A.; STURINO, J. M.; KANG, Y.; BARNHART, D. M.; DILEO, M. V.. From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. **Frontiers in Plant Science**. 7:1110, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01110

PORTUGAL, J. R.; ARF, O.; LONGUI, W. V.; GITTI, D. C.; BARBIERI, M. K. F.; GONZAGA, A. R.; TEIXEIRA, D. S.. Inoculação com *Azospirillum brasilense* via foliar associada à doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho XXIX

CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO - Águas de Lindóia - 26 a 30 de agosto de 2012.

PRUDENT, M., SALON, C., SOULEIMANOV, A.; EMERY, R. J. N.; SMITH, D. L.. Soybean is less impacted by water stress using *Bradyrhizobium japonicum* and thuricin-17 from *Bacillus thuringiensis*. **Agronomy for Sustainable Development**, v 35, p.749-757, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/>>. Acesso em: 20 fev. 2017. doi: 10.1007/s13593-014-0256-z.

REGENT INSTRUMENTS CANADA INC. **WinRHIZO Manual**, for root measurement. Ver Pro, 2013e. 2013.

RÊGO, M. C. F.; ILKIU-BORGES, F.; FILIPPI, M. C. C.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, G. B.. Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. **Journal of Botany**, v. 2014, p.10, 2014, ID 818797. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/818797>>.

SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M.. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos: **Documentos 241**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

SILVA, L. H. C. P.; VALIATI, V. A. H.; CAMPOS, H. D.; SILVA, J. R. C.. Efeito *in vitro* e *in vivo* de fungicidas no desenvolvimento de espécies de *Trichoderma*. **CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**. Cuiabá, 2010.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SILVA E. M. R.; SAGGIN-JÚNIOR, O. G.. Enhancement of clover growth by inoculation of P-solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizal fungi. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p.771-777, 2010. Trabalho apresentado na Academia Brasileira de Ciências. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652010000300023>>.

SOUZA, J. E. B. & FERREIRA, E. P. B.. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 237, p. 250–257, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.040>

THE R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **Reference Index**, version 3.3.2, 2016. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

THONAR, C.; LEKFELDT, J. D. S.; COZZOLINO, V.; KUNDEL, D.; KULHÁNEK, M.; MOSIMANN, C.; NEUMANN, G.; PICCOLO, A.; REX, M.; SYMANCZIK, S.; WALDER, F.; WEINMANN, M.; NEERGAARD, A.; MÄDER, P.. Potential of three microbial bio-effectors to promote maize growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. **Chemistry, Biology and Technology Agriculture**. v. 4, 2017. DOI 10.1186/s40538-017-0088-6

TSIGIE, A.; TILAK, K. V. B. R.; SAXENA, A.K. Field response of legumes to inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, p.971-974, 2011. doi: 10.1007/s00374-011-0573-1.

WU, Q.; ZOU, Y.; HE, X.; LUO, P.. Arbuscular mycorrhizal fungi can alter some root characters and physiological status in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. **Plant Growth Regulator** v. 65, p. 273–278, 2011. DOI 10.1007/s10725-011-9598-6.

ZOBEL, R. W.; KINRAIDE, T. B.; BALIGAR, V. C.. Fine root diameters can change in response to changes in nutrient concentrations. **Plant and Soil**. v. 297, p. 243–254, 2007. DOI 10.1007/s11104-007-9341-2

5 CAPÍTULO II – ANÁLISE DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE SOJA COINOCULADAS

RESUMO

A análise de crescimento vegetal é considerada internacionalmente como um método padrão para a estimativa de produtividade das comunidades vegetais. O fundamento dessa análise é a medida da acumulação de matéria orgânica na planta e da sua área foliar ao longo do ciclo. Mudanças no crescimento das plantas de soja de forma compensatória são responsáveis pela manutenção das produtividades à medida que ocorrem alterações no ambiente agrícola. Nesta perspectiva, a análise de crescimento pode avaliar o desenvolvimento das plantas de soja, buscando identificar as alterações provocadas pelos tratamentos testados. Considerando que os micro-organismos inoculados em sementes de soja podem induzir mudanças no seu crescimento, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito destas inoculações através da análise de crescimento. O experimento foi semeado no dia 09 de novembro de 2015 com o cultivar BMX Potência, conduzido após a colheita do trigo, no Município de Palmeira, PR. Os tratamentos testados foram: testemunha T1 (*B. japonicum*), T2 (*B. japonicum* e *A. brasilense*), T3 (*B. japonicum* e *T. asperellum*), T4 (*B. japonicum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) e T5 (*B. japonicum* e *P. bilaiae*) aplicados à semente. Realizou-se nove coletas periódicas de plantas e aferiu-se a massa seca das partes das plantas e sua área foliar com auxílio do programa WinFolia. Utilizando o software Statistica 12 conduziu-se a análise de variância, e a variação temporal da massa de matéria seca e da área foliar, foram ajustadas via regressão logística $y=a/(1+(x/b)^c)$. Com a massa seca e área foliar foram calculadas a taxa de crescimento absoluto; taxa de crescimento absoluto de raízes; taxa de crescimento relativo; taxa de crescimento relativo de raízes; índice de área foliar; taxa de assimilação líquida; razão de área foliar e razão de massa de raízes. Os micro-organismos *T. asperellum* e *P. bilaiae* coinoculados aumentaram a taxa de crescimento absoluto até V5 e taxa de assimilação líquida em toda a fase vegetativa, e, proporcionou acúmulo de massa seca de parte aérea e total no final do período reprodutivo. Os micro-organismos *A. brasilense*; *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* coinoculados com *B. japonicum* em sementes de soja são capazes de aumentar a taxa de crescimento relativo entre V2 e R1, a razão de área foliar e razão de massa de raízes na fase vegetativa, e a taxa de crescimento absoluto entre V7 e R5. A coinoculação de *T. asperellum* e *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* aumenta a taxa de crescimento absoluto de raízes entre V7 e R1, e taxa de crescimento relativo de raízes entre V3 e V4.

Palavras-chave: *Glycine max*, coinoculação, massa seca, índice de área foliar, taxa de crescimento.

GROWTH ANALYSIS IN COINOCULATED SOYBEAN PLANTS

ABSTRACT

Plant growth analysis is considered internationally as a standard method for plant communities' productivity estimation. It is based on measurement of the organic matter accumulation in the plant and its leaf area throughout the cycle. Changes in the growth of soybeans in a compensatory manner are responsible for the maintenance of yields as changes in the agricultural environment occur. In this perspective, the growth analysis can evaluate the development of the soybean plants, aiming to identify the changes caused by tested treatments. Considering that the microorganisms inoculated in soybean seeds can induce changes in the growth, the objective of this work was to verify their effect through growth analysis. The experiment was sown on November 9th, 2015 with the cultivar BMX Potência, conducted after the wheat harvest, in Palmeira, Paraná State. The treatments tested were: T1 (*B. japonicum*), T2 (*B. japonicum* and *A. brasilense*), T3 (*B. japonicum* and *T. asperellum*), T4 (*B. japonicum*, *T. virens* and *B. amyloliquefaciens*) and T5 (*B. japonicum* and *P. bilaiae*) applied to the seed. Nine periodic plants collections were carried out and the dry mass of the parts of the plants and their leaf area were evaluated with WinFolia program. Using the Statistica 12 software, the analysis of variance and the temporal variation of dry matter mass and leaf area were adjusted via logistic regression $y = a / (1 + (x / b)^c)$. With dry mass and leaf area were calculated: crop growth rate, root growth rate, relative growth rate; relative root growth rate, leaf area index, net assimilation rate, leaf area ratio and root mass ratio. The microorganisms *T. asperellum* and *P. bilaiae* coinoculated increased the absolute growth rate up to V5 and net assimilation rate throughout vegetative phase, and provided a dry mass accumulation of shoot and total mass at the end of the reproductive period. The microorganisms *A. brasilense*; *T. virens* and *B. amyloliquefaciens* coinoculated with *B. japonicum* in soybean seeds increase the relative growth rate between V2 and R1, leaf area ratio and root mass ratio at vegetative phase, and growth rate between V7 and R5. The co-inoculation of *T. asperellum* and *T. virens* and *B. amyloliquefaciens* increased absolute root growth rate between V7 and R1, and relative growth rate of roots between V3 and V4.

Key-words: *Glycine max*, co-inoculation, dry mass, leaf area index, growth rate.

5.1 INTRODUÇÃO

A análise de crescimento vegetal é considerada internacionalmente como um método padrão para a estimativa de produtividade das comunidades vegetais, sendo preciso para avaliar o desenvolvimento e mensurar a contribuição de diferentes processos fisiológicos sobre o comportamento vegetal. Nesta acepção, a massa seca é a variável ideal para medida do crescimento vegetal, porque reflete a capacidade das plantas em captar a energia solar e transformar tal energia através da fotossíntese (HASANAH et al., 2014).

O fundamento dessa análise está na determinação periódica de biomassa na planta, para avaliar sua evolução (MAGALHÃES, 1985). Nesse sentido, o estudo de análise de crescimento aplicada à soja permite avaliar e quantificar as taxas de crescimento, em diferentes condições de manejo, possibilitando quantificar a influência da inoculação e coinoculação no crescimento das diferentes estruturas da planta durante o ciclo.

A inoculação e o isolamento seletivo de micro-organismos promotores do crescimento vegetal é uma alternativa promissora para incrementar a produção vegetal em sistemas agrícolas mais sustentáveis (STEFAN et al., 2013). Neste sentido, vários mecanismos benéficos ocorrem na rizosfera das plantas e são atribuídos a alguns micro-organismos desejáveis, tais como a produção de fitormônios, antibióticos, sideróforos, solubilização de minerais, antagonismo e resistência a fitopatógenos e tolerância aos estresses abióticos, como seca, indisponibilidade de nutrientes e salinidade (SOUCHIE et al., 2010; HERMOSA et al., 2012; MARTINEZ-MEDINA et al., 2014; RÊGO et al., 2014).

A inoculação simultânea de mais de um micro-organismo, ou seja, a coinoculação também beneficia culturas vegetais de interesse, porém, sua eficiência é dependente de fatores como características pedológicas e o estágio de desenvolvimento vegetal no momento da coinoculação (MWANGI et al., 2013). Do mesmo modo, os micro-organismos inoculantes podem ser usados em diversas culturas agrícolas, porém seus efeitos variam em cada espécie vegetal (GONG et al., 2014).

Sabe-se que mudanças no crescimento das plantas de soja de forma compensatória são responsáveis pela manutenção das produtividades à medida que

ocorrem alterações no ambiente agrícola (YUSUF et al., 1999). Dentre tais alterações ambientais, a disponibilidade de N é uma delas e, neste sentido, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) através da relação de simbiose entre bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e a soja é amplamente difundida nos campos brasileiros. Entretanto, poucos estudam o crescimento ao longo de todo o ciclo em soja inoculada e coinoculada. Nesta perspectiva, a análise de crescimento pode avaliar o desenvolvimento das plantas de soja durante todo o ciclo, buscando identificar as alterações provocadas pelos tratamentos testados (CRUZ et al., 2010).

Micro-organismos benéficos inoculados nas sementes de soja, bactérias e fungos, proporcionam modificações nas características morfofisiológicas das plantas, logo, o uso de técnicas adequadas para a avaliação do desenvolvimento e crescimento de plantas, como a análise de crescimento, possibilitará identificar nas plantas e em suas estruturas, alterações morfofisiológicas estimuladas pela aplicação dos micro-organismos promotores de crescimento vegetal.

Com este trabalho objetivou-se avaliar plantas de soja coinoculadas com bactérias e fungos promotores do crescimento vegetal, por meio da análise de crescimento, visando determinar quais variáveis de crescimento e fisiológicas são alteradas, e em que momento as plantas apresentam estímulos provenientes dos micro-organismos coinoculados.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Caracterização do experimento

O experimento com soja foi semeado após a colheita do trigo, na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), localizada na Rodovia BR-277, km 175 (divisa com o rio Capivara), localidade de Manhoso, Papagaios Novos, Estrada Velha da Vilinha, no Município de Palmeira, PR (Latitude 25° 25' 44,33" Sul, Longitude 50° 03' 10,80" Oeste e altitude média de 836 metros). O solo, classificado como Cambissolo háplico; apresenta teores de 20 mg.dm⁻³ de P (resina), pH de 5,0 em CaCl₂, 2,9 de K, 44 de Ca, 24 de Mg, CTC de 165,9, saturação por bases (V%) de 43, em mmol_c.dm⁻³ e 22,2 g.dm⁻³ de C.

O clima na região é subtropical Cfb, segundo Köppen, ou seja, clima temperado propriamente dito. A temperatura média no mês mais frio fica abaixo de 18°C (mesotérmico), com verões frescos e temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C, sem estação seca definida.

O experimento foi semeado no dia 09 de novembro de 2015 com o cultivar BMX Potência. As plântulas emergiram no dia 15 de novembro de 2015 e o ciclo do cultivo completou-se com a colheita, no dia 06 de abril de 2016. A densidade de semeio foi 19 sementes por metro com a utilização da formulação 02-20-20 de NPK, aplicada na razão de 320 Kg por hectare.

As temperaturas (°C), precipitação (mm) e evapotranspiração (mm) médias no período de condução do experimento foram, respectivamente: 18,7 °C, 122 mm e 75 mm no mês de novembro; 20,2 °C, 153 mm e 78 mm em dezembro; 20,7 °C, 206 mm e 68 mm em janeiro; 20,7 °C, 173 mm e 56 mm em fevereiro; 19,7 °C, 128 mm e 61 mm em março e 17,7 °C, 100 mm e 56 mm em abril (IAPAR, 2017). O regime pluviométrico e temperaturas médias máximas e mínimas foram aferidos na EEACG, durante o período estudado (Tabela 1).

Tabela 1 - Temperatura máxima média (°C), temperatura mínima média (°C) e precipitação (mm) nos meses de novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março, na safra 15/16 e média histórica (1989-2015) para a Região de Palmeira, PR. Curitiba, PR, 2017.

		Período de cultivo					
		Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Média
Temperatura Máxima Média	Média Histórica*	24,9	26,3	26,8	26,6	25,7	26,1
	Safra 15/16**	23,9	25,6	26,6	26,7	25,5	25,6
Temperatura Mínima Média	Média Histórica	14,7	16,2	16,9	17,1	16,1	16,2
	Safra 15/16	16,2	18,0	17,3	18,6	16,5	17,3
Precipitação	Média Histórica	121,9	152,8	205,6	172,7	138,3	158,3
	Safra 15/16	173,0	457,5	273,5	295,5	224,0	284,7

FONTE: IAPAR*/EEACG**/Adaptado por BUSO (2017).

5.2.2 Material vegetal

A cultivar utilizada (BMX Potência) apresenta adaptação para a referida região (macrorregião sojícola 1), grupo de maturação 6,7, hábito de crescimento indeterminado, exige solos férteis, porte alto, peso de mil sementes igual a 168 g, índice de ramificação alto e resistente a acamamento. Apresenta bom desempenho

para abertura do plantio, sendo a data preferencial do plantio para a região entre 25 de outubro e 10 de dezembro. Produtividade estável e bom comportamento em áreas úmidas (várzea) (BRASMAX, 2014).

5.2.3 Tratamentos aplicados

Todas as sementes receberam inseticida Imidacloprido (150 g.L^{-1}) e Tiodicarbe (450 g.L^{-1}), na dose de $5 \text{ mL.kg semente}^{-1}$ e fungicida Carbendazim (150 g.L^{-1}) e Tiram (350 g.L^{-1}), na dose de 2 mL.kg^{-1} , que formaram a solução I. Os produtos com os micro-organismos foram diluídos em um protetor biológico rico em açúcares ($1,4 \text{ mL.kg semente}^{-1}$), que formou a solução II, devidamente homogeneizada. Em seguida, foi acrescentado à solução II, o inoculante *B. japonicum* semias 5079 e 5080, de acordo com a dose recomendada ($1,2 \times 10^6 \text{ UFC semente}^{-1}$), formando a solução III. Foram aplicadas sobre as sementes primeiramente a solução I (produtos químicos) e, posteriormente, a solução III (produtos biológicos; Tabela 2). A cada aplicação, as sementes foram agitadas em sacos plásticos inflados para completa homogeneização e secagem dos produtos aplicados.

Tabela 2 - Tratamentos, micro-organismos e doses utilizadas no tratamento de sementes de soja, em ensaio em campo, realizado na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais, município de Palmeira, PR, nas safras 2015/16. Curitiba, PR, 2017.

Tratamento	Micro-organismo/principio ativo	Dose aproximada.semente ⁻¹
T1 ¹	<i>B. japonicum</i> semia 5079 e 5080	1.200.000 UFC ²
T2	T1+ <i>A. brasilense</i> AbV5 e AbV6	23.000 UFC
T3	T1+ <i>T. asperellum</i> T211	1.500.000 Esporos viáveis
T4	T1+ <i>T. virens</i> (GI-3) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (TJ1000)	14.000 e 71.000 ³ UFC
T5	T1+ <i>P. bilaiae</i> P201 e P208	5.000 UFC

¹ - testemunha

² - unidades formadoras de colônias

³ - respectivamente

FONTE: BUSO (2017).

5.2.4 Amostragem e unidades experimentais.

As parcelas foram formadas com cinco linhas de 12 metros de comprimento, espaçadas 0,45 m entre si. Foram consideradas bordas as duas linhas laterais, e o primeiro e último metro de plantio de cada parcela. Dentro da área útil das parcelas

as coletas aleatórias de cinco plantas foram realizadas nas linhas dois e quatro, de maneira alternada entre as épocas durante o cultivo (Tabela 03), mantendo uma bordadura de 0,5 m com relação à coleta anterior. O delineamento utilizado foi blocos ao acaso com parcelas subdivididas no tempo, com cinco repetições e análise destrutiva das plantas.

Tabela 3 – Avaliações, datas das avaliações, dias após o plantio (DAP) e estádios, do ensaio conduzido Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), município de Palmeira, PR. Curitiba, PR, 2017.

Avaliação	Data	DAP	Estádio
Época 1	21/11/2015	12	VC
Época 2	01/12/2015	22	V2
Época 3	11/12/2015	32	V5
Época 4	22/12/2015	43	V7
Época 5	02/01/2016	54	R1
Época 6	15/01/2016	67	R3
Época 7	29/01/2016	81	R5
Época 8	19/02/2016	102	R6
Época 9	11/03/2016	123	R8

FONTE: EEACG/BUSO, 2017.

5.2.5 Avaliações

As plantas foram coletadas inteiras, com volume de solo amostrado de 0,2 m de cada lado da planta, por 0,2 m de profundidade. As raízes das plantas recém-coletadas foram mantidas em água mineral, até a realização das análises, que foram concluídas em, no máximo, 48h após a coleta.

As folhas frescas de cada planta foram identificadas e analisadas com auxílio de scanner no programa WinFolia Pro 2013a (REGENT INSTRUMENTS, 2014), para determinação da área foliar (AF, em cm²). As estruturas das plantas foram separadas e secadas em estufa a 65 +/- 4°C, até peso constante, para determinação da massa seca da parte aérea, composta por hastes, folhas com pecíolos, flores, vagens e grãos, quando presentes; massa seca de folhas; massa seca de raízes, composta por raízes e nódulos e massa seca total, sendo esta a soma da massa seca de parte aérea e massa seca de raízes.

A variação temporal da massa seca e da área foliar foram ajustadas via regressão logística, utilizando-se a equação $y=a/(1+(x/b)^c)$. Estas análises foram realizadas com o programa estatístico Statística v.12 (STATSOFT, 2013) para representar a progressão do crescimento ao longo do ciclo, onde (y) é a variável

resposta predita, em função do tempo; sendo “a”, “b” e “c” os coeficientes empíricos estimados estatisticamente, sendo, respectivamente, o ponto de máximo da planta, o parâmetro de integração e a taxa de maturidade e “x” a variável explicativa, tempo em dias após o plantio (YUSUF et al., 1999).

A taxa de crescimento absoluto (g.dia^{-1}) foi determinada pela razão entre as massas seca da parte aérea acumuladas em determinado período de tempo, independente da quantidade de massa seca que deu origem a este ganho. A taxa de crescimento absoluto de raízes (g.dia^{-1}) foi calculada pela razão entre as massas secas de raízes acumuladas em determinado período de tempo. A taxa de crescimento relativo ($\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) é a subtração do logaritmo neperiano da massa seca da parte aérea entre dois períodos, em razão do tempo entre tais pesagens, em dias, sendo esta a medida mais apropriada para avaliação de crescimento vegetal (FERNEDA et al., 2016). A taxa de crescimento relativo de raízes ($\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) é a subtração do logaritmo neperiano da massa seca de raízes entre dois períodos, em razão do tempo, em dias, de tais pesagens.

O índice de área foliar ($\text{m}^2.\text{m}^{-2}$) foi calculado pela relação entre a soma da área das folhas e a área de terreno que ocupa, indicando sua capacidade de interceptação e absorção de luz (HEIFFIG et al., 2006). A taxa de assimilação líquida ($\text{g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$) foi calculada pela razão entre o acúmulo de massa seca da parte aérea e a área foliar disponível em um determinado período. A razão de área foliar ($\text{dm}^2.\text{g}^{-1}$) é o quociente entre área foliar e massa seca de toda a planta. A razão de massa de raízes (g.g^{-1}) foi calculado pelo quociente da massa seca de raízes e massa seca total da planta.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As equações de regressão apresentam elevados ajustes aos pontos preditos para as variáveis de massa seca da parte aérea ($R^2 > 0,98$), folhas ($R^2 > 0,89$), raízes ($R^2 > 0,90$) e total ($R^2 > 0,98$) (Figura 1).

A massa seca da parte aérea em R3 (67DAP) foi de 400 g.m^{-2} para os tratamentos testados, com tendência de manter as taxas de acúmulo de massa até R6 (Figura 1 A). Destaque para os tratamentos T3 e T5, pois mantiveram as taxas de acúmulo de massa na parte aérea e total depois de R6, promovido pelo aumento

de massa nas hastes e, principalmente, nos grãos (Figura 1 A e B). Os tratamentos T3 e T5 também possibilitaram maiores pontos de máximo (coeficiente a) e parâmetro de integração (b) (Figura 1). Corroborando neste entendimento, a massa seca da parte aérea, avaliada aos 65 dias, era de 400 g.m^{-2} e, aos 105 dias, era de 800 g.m^{-2} . Todavia, a estes valores de massa seca não eram somados as massas das estruturas reprodutivas (flores, vagens e grãos) e caem a partir dos 115 dias após o plantio (CLAWSON et al., 1986). Neste sentido, a inflexão da curva de regressão para massa seca total (somados raízes, caule e folhas, mas sem as estruturas reprodutivas) ocorre aos 112 dias, independente do regulador de crescimento utilizado (CAMPOS et al., 2008).

No presente estudo, considerando as variáveis mais completas, massa seca da parte aérea e massa seca total, em que são somadas as massas de estruturas vegetativas (fontes) e reprodutivas (drenos) observa-se que o crescimento ocorre ao longo de todo o período estudado. Como resultado, estas variáveis apresentam crescimento positivo até o final do ciclo, que é representado de maneira adequada pelo modelo logístico com $R^2 > 98\%$.

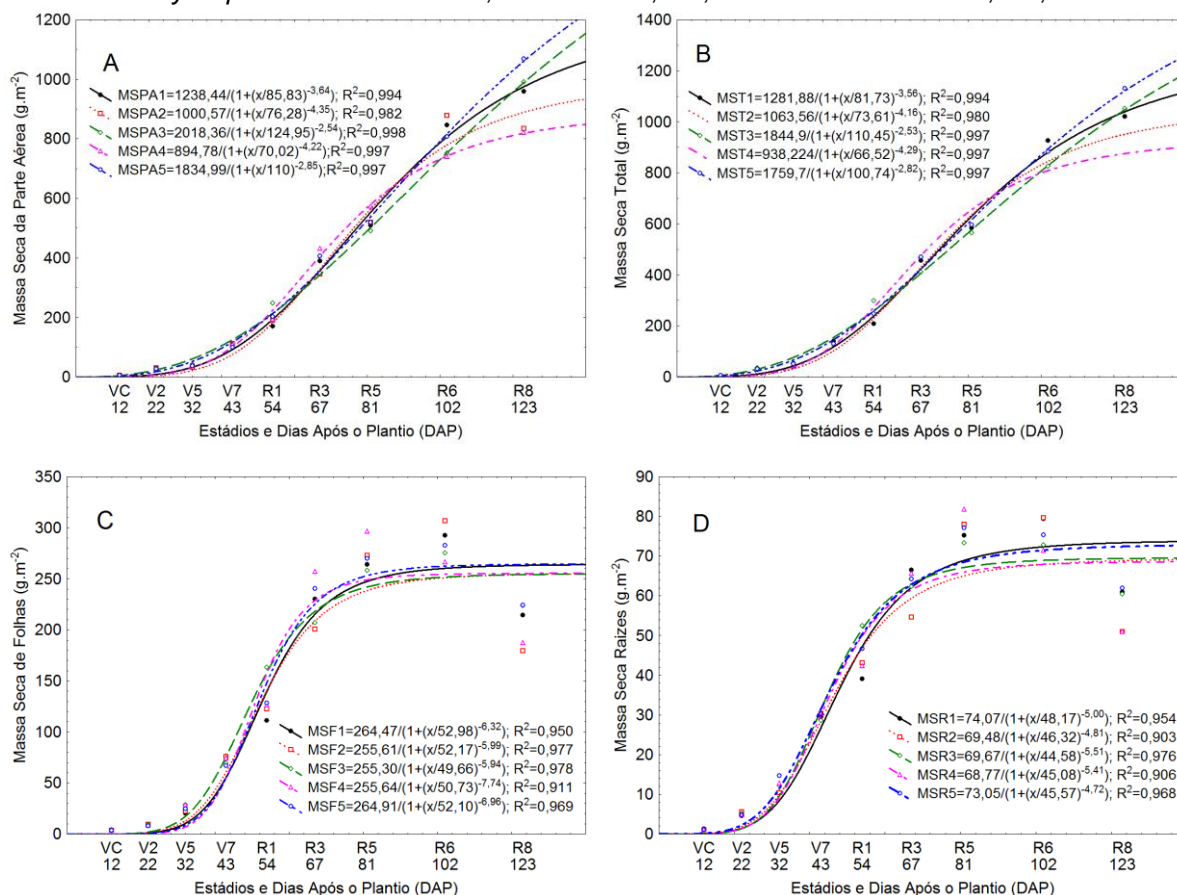
Observa-se tendência semelhante para a variável massa seca total (Figura 1 B), para os tratamentos T3 e T5, pois possibilitaram maior acúmulo de massa seca total no período reprodutivo, com 1000 g.m^{-2} e 1100 g.m^{-2} respectivamente, ficando acima da testemunha em R8 (123 DAP).

A massa seca total de plantas, incluindo os valores de massa das estruturas reprodutivas das plantas, apresentou diferença acentuada na fase reprodutiva, em função da irrigação ou não da soja, com valores superando 1000 g.m^{-2} aos 110 dias após o plantio e tendência de alta (PEREIRA, 2002), ratificando os valores e tendência observados no presente estudo. Considerando as massas das raízes, hastes, folhas e vagens, e utilizando dados ajustados por uma função polinomial exponencial, Cruz et al. (2010) observaram o ponto máximo de massa seca aos 90 dias para a primeira época de plantio de soja avaliada no oeste baiano.

Para a variável massa seca de folhas (Figura 1 C), verifica-se que os tratamentos coinoculados foram superiores ao tratamento inoculado T1 (testemunha) durante a fase vegetativa (até R1; 54 DAP), podendo indicar maior influência sobre a capacidade fotossintética das plantas. Este efeito positivo da coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* sobre a massa seca de folhas foi observado no desenvolvimento inicial de plântulas de soja para esta mesma variável

(LIBORIO et al., 2016). O aumento da massa seca de folhas ocorre até o final do período vegetativo e, aos 67 dias (R3), estabiliza-se segundo a função apresentada (Figura 1 C).

Figura 1 – A) massa seca da parte aérea – MSPA; B) massa seca total – MST; C) massa seca de folhas - MSF; e D) massa seca de raízes – MSR; por metro quadrado, em nove épocas de avaliação de plantas de soja inoculada com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*; *T. asperellum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* e *P. bilaiae*, em Palmeira, PR, safra 2015/16. Curitiba, PR, 2017.



FONTE: BUSO (2017).

A maior massa seca de folhas, na fase vegetativa dos tratamentos coinoculados, provavelmente é devido ao maior acúmulo de massa seca de raízes proporcionada pelos micro-organismos promotores de crescimento nestes tratamentos. O aumento do desenvolvimento do sistema radicular pode ocorrer por maior ramificação, deformação dos pêlos radiculares, aumento da divisão das células do córtex das raízes, aumento da produção de exsudatos e flavonóides provocados pela coinoculação (DARDANELLI et al., 2008). Comprovando tais benefícios, a massa seca de raízes dos tratamentos coinoculados foi superior ao tratamento testemunha (T1), até os 54 DAP (Figura 1 D). Numa situação de estresse

hídrico, raízes maiores conseguiriam explorar melhor o solo e captar água em maiores profundidades (FARIAS et al., 2007); nestas condições, plantas coinoculadas poderiam ser beneficiadas pelos estímulos dos micro-organismos, suportando melhor possíveis condições adversas na implantação da lavoura. Similar ao que ocorre na massa seca de folhas, a massa seca de raízes estabiliza a partir de R5, indicando translocação de assimilados para as estruturas reprodutivas, principalmente para os grãos, a partir de 66 dias após a emergência (PEREIRA, 2002).

Evidenciando o efeito dos micro-organismos, a taxa de crescimento absoluto para os tratamentos T3 (*T. asperellum*) e T5 (*P. bilaiae*) foram superiores aos outros tratamentos testados até V7 (43 DAP) (Figura 2 A). A partir desta época, os tratamentos com *A. brasilense* (T2) e *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* (T4) foram superiores, atingindo o ponto máximo em R4 e em R3 (67 DAP), respectivamente. Ao comparar o acúmulo de massa seca de raízes (Figura 1 C) aos 67 DAP, observa-se que estes dois tratamentos estão com valores inferiores ao tratamento T1 nos estádios de maior taxa de crescimento absoluto, indicando redução do crescimento de raízes e aumento da massa absoluta de folhas nesse estágio. O efeito positivo da inoculação com *Bradyrhizobium* spp. em aumentar a taxa de crescimento absoluto foi comprovado aos 38 dias após o plantio de soja, comparado ao controle sem inoculante, aplicação de N e outros dois tratamentos com esterco (HASANAH et al., 2014).

Em R5, o T1 (*B. japonicum*) atingiu o ponto máximo da taxa de crescimento absoluto e abaixo aparece o T5 (*P. bilaiae*) em R5 (90 DAP) (Figura 2 A), com ponto máximo de $13,5 \text{ g.dia}^{-1}$, e ainda o T3 (*T. asperellum*) com $12,0 \text{ g.dia}^{-1}$. Confirmando os valores da taxa de crescimento absoluto, o ponto máximo ocorre entre $12,5$ e 19 g.dia^{-1} , mas pode variar de acordo com o cultivar (CLAWSON et al., 1986). Em resumo, as folhas das plantas nos tratamentos T2 (*A. brasilense*) e T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) tiveram maior velocidade de crescimento até os primeiros estádios reprodutivos, enquanto as folhas das plantas nos tratamentos T3 (*T. asperellum*) e T5 (*P. bilaiae*) apresentaram menor velocidade de crescimento, entretanto, o período de crescimento foi maior, persistindo até o enchimento de grãos (R5). Esses resultados podem indicar que os tratamentos T3 e T5, promoveriam maior translocação dos fotoassimilados, o que melhoraria os componentes de rendimento em soja.

O ponto de inflexão das curvas das taxas de crescimento absoluto de raízes está entre os 43 e 54 DAP, período imediatamente anterior à fase reprodutiva (R1). Os micro-organismos promotores de crescimento coinoculados não somente aceleram o desenvolvimento das raízes, fortalecendo esta estrutura no período vegetativo (BELLONE, 2011; ENTESARI et al., 2013; MASCIARELLI et al., 2014; LIBORIO et al., 2016; SOUZA & FERREIRA, 2017), mas também antecipam os pontos máximos e a queda de crescimento, podendo indicar senescência. Os tratamentos coinoculados antecipam as fases de desenvolvimento das raízes em cerca de seis dias, deslocando as curvas das taxas de crescimento absoluto de raízes destes tratamentos para a esquerda, quando comparado ao controle (T1 - *B. japonicum*).

Nas figuras 2 A e 2 B observa-se que as raízes apresentam crescimento em taxas menores, com o máximo de 2 g.dia^{-1} entre V7 (43 DAP) e R1 (54 DAP), valor baixo quando comparado à TCA, que apresenta valores acima de 2 g.dia^{-1} a partir de V5 (32 DAP) até R8.

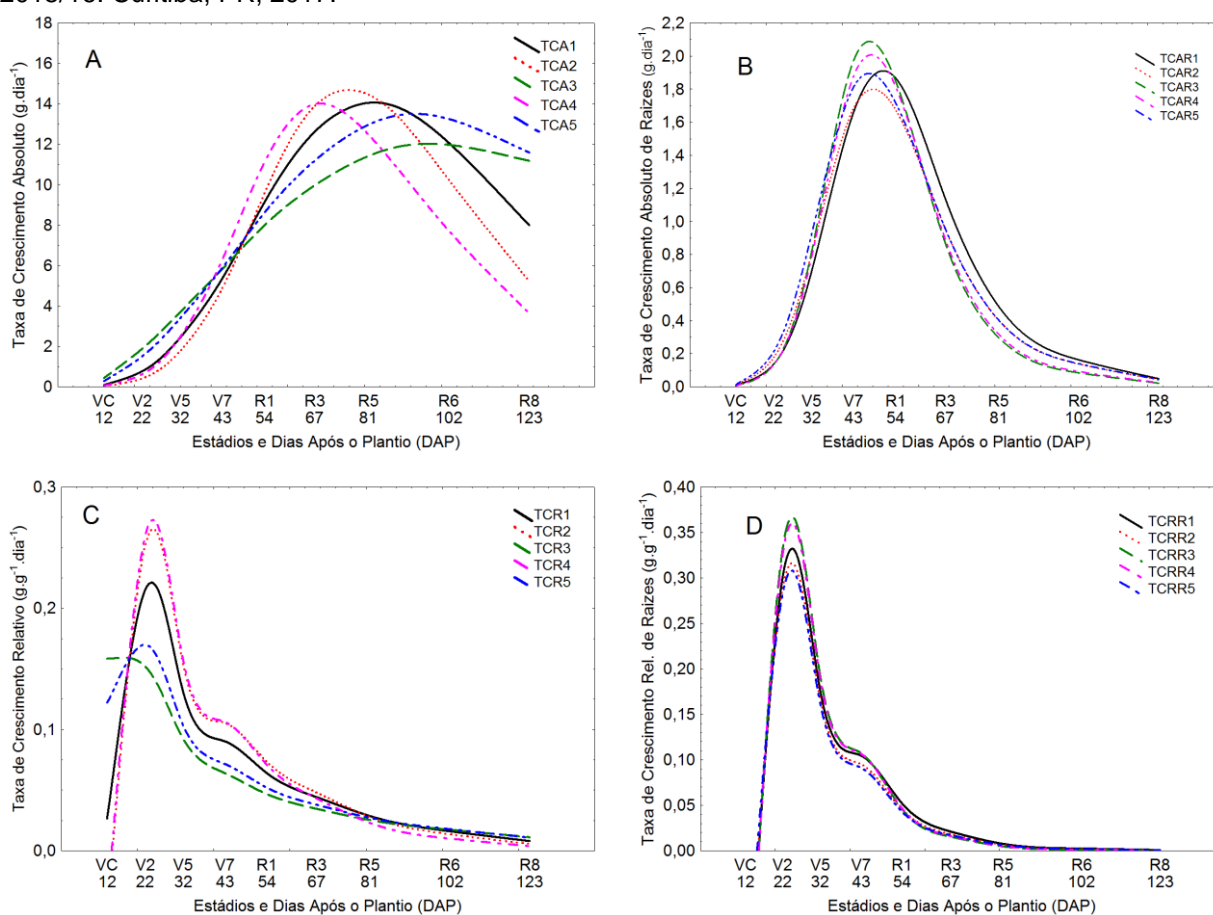
Os tratamentos T3 (*T. asperellum*) e T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) apresentaram os maiores pontos de máxima, indicando que estes tratamentos podem ter induzido uma melhora nos processos fisiológicos responsáveis por este crescimento (Figura 2 B). Estes tratamentos ainda estavam acumulando cerca de 10% a mais de massa seca durante o final do período vegetativo, comparado ao controle. Nestes tratamentos é provável que os vários mecanismos de ação atribuídos ao *Trichoderma* estejam corroborando para alcançar o ponto de máximo maior, como aumento direto do crescimento de raízes, aumento da resistência sistêmica às doenças, aumento da resistência sistêmica a estresses, melhor vigor em sementes e aumento na eficiência do uso de N (HARMAN, 2011).

Os tratamentos T3 (*T. asperellum*) e T5 (*P. bilaiae*) apresentam a taxa de crescimento relativo inicialmente altas aos 12 DAP, entre $0,125 \text{ g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $0,150 \text{ g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Figura 2 C). Em V2, os tratamentos T1 (*B. japonicum*), T2 (*A. brasilense*) e T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) alcançam o ponto de máximo, período em que tais tratamentos apresentaram a taxa de crescimento relativo, 25% acima da testemunha (T1). Após o período de intenso acúmulo de massa seca, ocorre redução em V5 e os tratamentos T3 (*T. asperellum*) e T5 (*P. bilaiae*) seguem com taxas inferiores. Nos estádios reprodutivos, todos os tratamentos seguem com taxas

de crescimento relativo apresentando a mesma tendência até o final do ciclo (R8) (Figura 2 C).

Constata-se que os tratamentos T3 (*T. asperellum*) e T5 (*P. bilaiae*) apresentavam maior taxa de crescimento absoluto (TCA) entre V2 e V7, que por definição é o denominador da equação para cálculo da TCR. Assim, quanto maior a TCA, menor a TCR no período. Os valores encontrados e comportamento das curvas para esta variável corroboram com PEREIRA (2002). Neste sentido, o tratamento com inoculante *B. japonicum* apresentou TCR superior aos tratamentos adubados e controle aos 25 DAP (HASANAH et al., 2014).

Figura 2 – A) Taxa de crescimento absoluto – TCA; B) Taxa de crescimento de raízes – TCAR; C) taxa de crescimento relativo – TCR; D) Taxa de crescimento relativo de raízes – TCRR; em nove épocas de avaliação de plantas de soja inoculada com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*; *T. asperellum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* e *P. bilaiae*, em Palmeira, PR, safra 2015/16. Curitiba, PR, 2017.



FONTE: BUSO (2017).

A taxa de crescimento relativo de raízes acompanha a taxa de crescimento relativo, ou seja, apresentam um crescimento rápido no período de estabelecimento

do cultivo até chegar ao ponto de máximo que, no presente trabalho, ocorreu aos 25 DAP, coincidindo com o ponto de máximo destas duas variáveis. Os tratamentos T3 e T4 apresentam taxa de crescimento de raízes mais elevada ($0,37 \text{ g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), indicando que os tratamentos coinoculados com *Trichoderma* podem contribuir para o crescimento de raízes (LOBO JUNIOR et al., 2009; HARMAN, 2011).

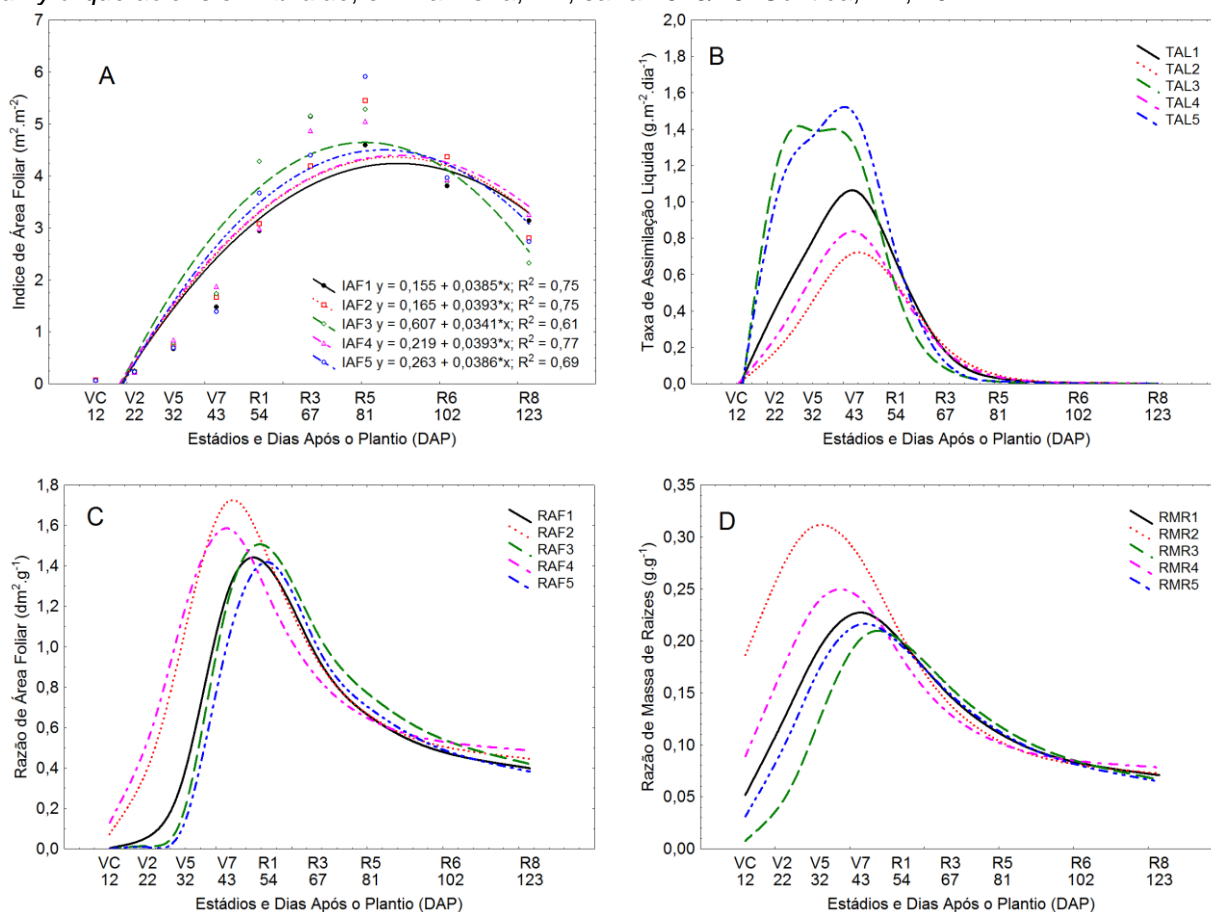
O índice de área foliar no tratamento T3 (*T. asperellum*) é maior do que os outros tratamentos entre V5 e R1 (32 e 54 DAP) Na época seguinte (R3), o tratamento T5 (*B. japonicum* e *P. bilaiae*) aparece com índice de área foliar mais alto (Figura 3 A). Os pontos de máximo observados ocorrem em R3 (67 DAP) para o tratamento T1 (*B. japonicum*) e em R5 (81 DAP), para os tratamentos coinoculados (T2 ao T5), corroborando com os pontos de máximo para esta variável, entre 60 e 90 dias após o plantio e valores entre 4,5 e 9 (PEREIRA, 2002) e entre 3 e 4 (MOREIRA et al., 2015). A mesma tendência foi observada na soja cultivada em plantio direto e convencional, com ponto de máximo ocorrendo em R5 (63 DAP), mas com diferença entre tais tratamentos para índice de área foliar até a fase R4 e valores máximos de apenas $2 \text{ m}^2.\text{m}^{-2}$ (YUSUF et al., 1999).

A taxa de assimilação líquida máxima foi observada em V3 (27 DAP) para o tratamento T3 (*T. asperellum*) e aos 43 DAP (V7) para os demais tratamentos (Figura 3 B), coincidindo com a época de alta radiação e temperaturas do mês de dezembro (PEREIRA, 2002). Os tratamentos T3 e T5 apresentaram taxa de assimilação líquida acima dos outros tratamentos desde VC (12 DAP) até aproximadamente os 50 DAP, evidenciando que os estímulos proporcionados pelos micro-organismos promotores de crescimento nesses dois tratamentos podem ter aumentada a eficiência fotossintética das folhas no período vegetativo. Por ser também dependente de fatores externos, principalmente radiação (PEIXOTO et al., 2011), a taxa de assimilação líquida cai a partir de V7 e cessa em R5, sugerindo maturidade fisiológica e translocação de assimilados para as partes reprodutivas, posteriormente para os grãos, período em que o índice de área foliar também se estabiliza (Figura 3 A).

Os tratamentos T2 e T4 apresentaram razão de área foliar superior aos demais tratamentos, desde o início do desenvolvimento (VC) até ponto de máximo no estágio V7 (43 DAP) (Figura 3 C). A razão de área foliar destes tratamentos pode ter sido favorecida pela taxa de crescimento relativo nesse período (Figura 2 C). Provavelmente, as bactérias *A. brasilense* e *B. amyloliquefaciens* através dos seus

mecanismos de ação influenciaram no aumento da razão de área foliar, especialmente pela produção de fitormônios (TIEN et al., 1979; BOTTINI et al., 1989; PERRIG et al., 2007). Validando esta informação, a aplicação de reguladores vegetais com funções semelhantes aumentou a razão de área foliar em soja entre 60 e 86 dias após a semeadura (CAMPOS et al., 2008).

Figura 3 – A) Índice a área foliar – IAF; B) Taxa de assimilação líquida – TAL; C) Razão de área foliar – RAF e D) Razão de massa de raízes – RMR em nove épocas de avaliação de plantas de soja inoculada com *B. japonicum* e coinoculadas com *A. brasilense*, *T. asperellum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* e *P. bilaiae*, em Palmeira, PR, safra 2015/16. Curitiba, PR, 2017.



FONTE: BUSO (2017).

Os tratamentos T1 (*B. japonicum*), T3 (*T. asperellum*) e T5 (*P. bilaiae*) tiveram o ponto de máximo crescimento da razão de área foliar no final da fase vegetativa (V7) e a queda destas taxas ocorreu junto com as taxas dos demais tratamentos: T1 (*B. japonicum*), T2 (*A. brasilense*) e T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*).

Com tendência semelhante à razão de área foliar, a razão de massa de raízes do tratamento T2 (*A. brasilense*) foi superior aos demais, chegando ao ponto de

máximo em V5, com valor de $0,31 \text{ g.g}^{-1}$, acompanhado pelo tratamento T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*), com ponto de máximo em V6 com razão de massa de raízes de $0,25 \text{ g.g}^{-1}$. O aumento da razão de massas de raízes e aumento do sistema radicular nas fases iniciais do desenvolvimento pode contribuir para o estabelecimento do cultivo, fundamental para manter o estande e potencial produtivo almejado (FARIAS et al., 2007).

Em R1 todos os tratamentos apresentam a mesma tendência de razão de área foliar e razão de massa de raízes. Neste estágio, as massas secas de folhas e raízes estão nos seus pontos de máximo. Com a conversão do crescimento para as porções reprodutivas, as variáveis massa seca da parte aérea e massa seca total continuam aumentando, enquanto o crescimento em porções vegetativas da planta cai e tende a cessar. No caso da razão de área foliar e razão de massa de raízes, após R1, todos os tratamentos apresentam queda destas taxas e, entre R5 e R8, parece ocorrer a manutenção de algumas folhas e raízes, a fim de continuar a manter as funções mínimas da planta até o final do ciclo.

5.4 CONCLUSÕES

Os micro-organismos *T. asperellum* e *P. bilaiae* coinoculados aumentaram a taxa de crescimento absoluto até V5 e taxa de assimilação líquida em toda a fase vegetativa, e, proporcionou acúmulo de massa seca de parte aérea e total no final do período reprodutivo.

Os micro-organismos *A. brasilense*; *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* coinoculados com *B. japonicum* em sementes de soja são capazes de aumentar a taxa de crescimento relativo entre V2 e R1, a razão de área foliar e razão de massa de raízes na fase vegetativa, e a taxa de crescimento absoluto entre V7 e R5.

A coinoculação de *T. asperellum* e *T. virens* e *B. amyloliquefaciens* aumentou a taxa de crescimento absoluto de raízes entre V7 e R1, e taxa de crescimento relativo de raízes entre V3 e V4.

5.5 REFERÊNCIAS

- BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; CORDILEONE, V.. Related growth parameters in soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Crop Improvement**, v. 25, p. 472–487, 2011. DOI: 10.1080/15427528.2011.583716.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.
- BRASMAX. Cultivares recomendados para a região sul. Disponível em: <http://brasmxgenetica.com.br/>; acessado em: 16/07/2014.
- CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; BOARO, C. S. F.; RODRIGUES, J. D.. Análise de crescimento em plantas de soja tratadas com substâncias reguladoras. **Biotemas**, v. 21, n.3, p. 53-63, setembro de 2008. ISSN 0103 – 1643
- CLAWSON, K. L.; SPECHT, J. E.; BLAD, B. L.. Growth Analysis of Soybean Isolines Differing in Pubescence Density. **Agronomic Journal**. v. 78, p. 164-172, 1986.
- CRUZ, T. V.; PEIXOTO, C. P.; MARTINS, M. C.. Crescimento e produtividade de soja em diferentes épocas de semeadura no oeste da Bahia. **Scientia Agraria**, v.11, n.1, p.033-042, Jan./Feb. 2010.
- DARDANELLI, M. S.; CORDOBA, F. J. F.; ESPUNY, M. R.; CARVAJAL, M. A. R.; DIAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y.; MEGIAS, M.. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress **Soil Biology and Biochemistry**. v. 40, p. 2713–2721, 2008. doi:10.1016/j.soilbio.2008.06.016
- ENTESARI, M.; SHARIFZADEH, F.; AHMADZADEH, M.; FARHANGFAR, M.. Seed biopriming with *Trichoderma* Species and *Pseudomonas fluorescent* on growth parameters, enzymes activity and nutritional status of soybean. **International Journal of Agronomy and Plant Production**. v. 4, p. 610-619, 2013.
- FARIAS, J. R. B., NEPOMUCENO, A. L., NEUMAIER, N.. Fisiologia da soja. **Circular Técnica 48**. Embrapa Soja, 2007. ISSN 1516-7860.
- FERNEDA, B. G.; BOEING, E.; SILVA, A. C.; SOUZA, A. P.; SILVA, S. G.; MARTIM, C. C.; PALADINO, F. G.; TANAKA, A. A.. Graus-dias na estimativa das taxas de crescimento de quatro cultivares de soja em diferentes épocas de plantio. **Nativa**, v.4, n.3, p.121-127, mai./jun. 2016. DOI: 10.14583/2318-7670.v04n03a01.
- GONG, M.; DU, P.; LIU, X. ZHU, C.. An effective method for screening and testing the true phosphate-solubilizing fungus that enhances corn growth. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, p. 60-70, ago 2014. ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760.
- HARMAN, G. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**. v. 189, p. 647-649, Feb. 1, 2011. ISSN: 0028646X.

HASANAH, Y.; NISA, T. C.; HAPSOH; HANUM, H.. Growth Analysis of Soybean Varieties at Dry Land With Application of Nitrogen Sources. **International Journal of Scientific and Technology Research**. v. 3, n. 6, junho de 2014. ISSN 2277-8616.

HEIFFIG, L. S.; CÂMARA, G. M. S.; MARQUES, L. A.; PEDROSO, D. B.; PIEDADE, S. M. S.. Fechamento e índice de área foliar da cultura da soja em diferentes arranjos espaciais. **Bragantia**, v.65, n.2, p.285-295, 2006.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E.. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p.17-25, 2012. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/>>. Acesso em: 22 abr. 2016. doi: 10.1099/mic.0.052274-0.

LIBÓRIO, P. H. S.; BÁRBARO-TORNELI; I. M.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; NÓBILE, F. O.; MIGUEL, F. B.; SILVA, F. M.. Interação entre cultivares, bactérias e micronutrientes na germinação e desenvolvimento inicial de soja. **Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 1, 2016.

LOBO JUNIOR, M.; BRANDÃO, R. S.; GERALDINE, A. M.. Produtividade do Feijoeiro Comum, em Campo, em Tratamentos com *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*. **Comunicado técnico 184**, 2009. ISSN 1678-961X

MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. São Paulo, EPU, 1985. V.1, p.331 - 351.

MARTÍNEZ-MEDINA A., ALGUACIL M. D. M., PASCUAL J. A., VAN WEES S. C. M.. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. **Journal of Chemical Ecology**. v. 40 p. 804–815, 2014. DOI: 10.1007/s10886-014-0478-1

MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V.. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation **Microbiological Research**. v. 169, p. 609–615, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.001>

MOREIRA, E. N.; PAUL, O. A.; RODRIGUEZ, F. A.; JESUS, W. C.. Temporal dynamics of soybean rust associated with leaf área index in soybean cultivars of different maturity groups. **Plant Disease**. v. 99, n. 9, p. 1216-1226, 2015. [HTTP://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-14-1029-RE](http://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-14-1029-RE).

MWANGI, A. M. K.; KAHANGI, E. M.; ATEKA, E.; ONGUSO, J.; MUKHONGO, R. W.; MWANGI, E. K.; JEFWA, J. M.. Growth effect of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p.152-162, 2013. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/apsoil>. Acesso em: 22 abr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.002>.

PEIXOTO, C. P.; CRUZ, T. V.; PEIXOTO, M. F. S. P.. **Análise Quantitativa do Crescimento de Plantas: Conceitos e Prática** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, vol.7, n.13, p. 51-76, 2011.

PEREIRA, C. R. Análise do crescimento e desenvolvimento da cultura de soja sob diferentes condições ambientais. **Tese em Engenharia Agrícola**, UFV, p. 282, 2002.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

REGENT INSTRUMENTS CANADA INC. **WinFolia manual for leaf measurement**. Ver 2013a. 2014.

RÊGO, M. C. F.; ILKIU-BORGES, F.; FILIPPI, M. C. C.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, G. B.. Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. **Journal of Botany**, v. 2014, p.10, 2014, ID 818797. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/818797>>.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SILVA E. M. R.; SAGGIN-JÚNIOR, O. G.. Enhancement of clover growth by inoculation of P-solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizal fungi. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p.771-777, 2010. Trabalho apresentado na Academia Brasileira de Ciências. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652010000300023>>.

SOUZA, J. E. B. & FERREIRA, E. P. B.. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 237, p. 250–257, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.040>.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 12e. 2013. **Manual de instruções**. www.statsoft.com

STEFAN, M.; MUNTEANU, N.; STOLERU, V.; MIHASAN, M.; HRITCU, L. Seed inoculation with plant growth promotion rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 22-29, 2013.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

YUSUF, R. I.; SIEMENS, J. C.; BULLOCK, D. G.. Growth analysis of soybean under no-tillage and conventional tillage systems. **Agronomy Journal**. v. 91, p. 928–933, 1999.

6 CAPÍTULO III – INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO EM SOJA A CAMPO: RESPOSTA NO ESTÁDIO VEGETATIVO E NO RENDIMENTO AGRÍCOLA

RESUMO

O uso de *Bradyrhizobium* spp para inoculação de sementes de soja é uma tecnologia comprovada e novas alternativas estão sendo estudadas para aumentar os ganhos a partir de seu uso. Considerando que o uso de *Bradyrhizobium* em soja é capaz de fornecer todo o nitrogênio necessário para o completo desenvolvimento do cultivo através da fixação biológica do N₂ disponível no ar, parece razoável sugerir que outros micro-organismos possam contribuir de maneiras diversas para o crescimento das plantas, ajudando estas a aumentar seu rendimento. O objetivo deste trabalho foi comparar a resposta das plantas de soja submetidas à aplicação de quatro combinações de micro-organismos promotores do crescimento vegetal, em duas safras consecutivas, avaliando-se os componentes morfofisiológicos no estágio V6 das plantas, e seu rendimento no estágio R8. Foram instalados dois experimentos a campo no município de Palmeira, PR. Comparou-se com o T1 (*B. japonicum*) a coinoculação deste micro-organismo com T2 (*A. brasilense*); T3 (*T. asperellum*); T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) e T5 (*P. bilaiae*). Avaliou-se estatura de plantas, comprimento da raiz principal, número de nódulos na raiz principal, número de nódulos nas raízes secundárias, nódulos totais; com a ajuda do programa WinFolia Pro 2013a determinou-se número de folhas e área foliar, e com o auxílio do programa WinRhizo Pro 2013e determinou-se nas raízes as variáveis comprimento total, área projetada, superfície de contato, diâmetro médio, volume, número de pontas e número de forquilha. Os tratamentos T1 (*B. japonicum*), T4 (*B. japonicum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) e T5 (*B. japonicum* e *P. bilaiae*) diferenciaram-se do tratamento T2 (*B. japonicum* e *A. brasilense*) para número de nódulos na raiz principal. O T4 foi superior ao T2 para massa seca de nódulos na raiz principal. Os tratamentos T3 (*B. japonicum* e *T. asperellum*) e T4 (*B. japonicum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) foram superiores aos demais para área foliar, e ambos diferentes do T1 para número de folhas por planta. O tratamento T5 (*B. japonicum* e *P. bilaiae*) apresentou rendimento 107 kg.ha⁻¹ acima da testemunha (T1 - *B. japonicum*), diferente do T3 (*B. japonicum* e *T. asperellum*). Com base nos estudos realizados, é possível concluir que as diferentes combinações de micro-organismos aplicados às sementes de soja estimulam o crescimento de diferentes variáveis estudadas. O tratamento com *B. japonicum* e *P. bilaiae* apresentou maior rendimento, superior ao tratamento coinoculado com *T. asperellum*.

Palavras-chave: *Glycine max*, micro-organismos, nodulação, massa seca.

SOYBEAN INOCULATION AND COINOCULATION AT A FIELD TRIAL: VEGETATIVE GROWTH AND YIELD RESPONSES

ABSTRACT

The use of *Bradyrhizobium* spp for soybean seeds inoculation is a proven technology, new alternatives are being studied to increase the gains from its use. Considering that the use of *Bradyrhizobium* in soybean provides all the necessary nitrogen to complete development of crop through biological fixation of N₂ available in the air, it seems reasonable to suggest that other microorganisms can contribute in diverse ways to plants growth, helping to increase yield. The objective of this work was to compare the response of the soybean plants submitted to the application of four plant growth promoter microorganisms combinations, in two consecutive seasons, at V6 phase and their yield, two field experiments were installed at Palmeira County, PR. T1 (*B. japonicum*) was compared with the coinoculation of this microorganism with T2 (*A. brasilense*); T3 (*T. asperellum*); T4 (*T. virens* and *B. amyloliquefaciens*) and T5 (*P. bilaiae*). It was evaluated plant height, main root length, main root number of nodules, secondary roots number of nodules, total nodules. With the help of WinFolia Pro 2013a program was determined leaf number and leaf area, and with the aid of the program WinRhizo Pro 2013 determined total roots length, projected area, contact surface, mean diameter, volume, number of points and number of forks. The treatments T1 (*B. japonicum*), T4 (*B. japonicum*, *T. virens* and *B. amyloliquefaciens*) and T5 (*B. japonicum* and *P. bilaiae*) were differentiated from T2 treatment (*B. japonicum* and *A. brasilense*) for main root number of nodules. T4 was higher than T2 for main root nodule dry mass. The treatments T3 (*B. japonicum* and *T. asperellum*) and T4 (*B. japonicum*, *T. virens* and *B. amyloliquefaciens*) were superior to the others for leaf area, and both were different from T1 for leaf number per plant. The treatment T5 (*B. japonicum* and *P. bilaiae*) presented yield 107 kg.ha⁻¹ above control (T1- *B. japonicum*), different only from T3 (*B. japonicum* and *T. asperellum*). Based on carried out studies, it is possible to conclude that different combinations of microorganisms applied to soybean seeds stimulate the growth of different studied variables. Treatment with *B. japonicum* and *P. bilaiae* presented higher yield, superior to treatment with *T. asperellum*.

Key-words: *Glycine max*, microorganism, nodulation, dry mass.

6.1 INTRODUÇÃO

A soja representa 49% da produção agrícola brasileira de grãos, ocupando uma área de 33,9 milhões de hectares e sendo responsável por alavancar as exportações (CONAB, 2017).

Devido a sua habilidade de associação com bactérias do gênero *Rhizobium* e de formar os nódulos para fixação biológica de nitrogênio (FBN), também é uma das Fabaceas mais plantadas no mundo (THILAKARATHNA & RAIZADA, 2017). Fonte de proteína, demanda cerca de 240 kg.ha⁻¹ de N exportados nos grãos, que podem ser suficientemente supridos pelo processo de FBN, gerando ganhos de 8% de rendimento (HUNGRIA et al., 1994). Este processo está bastante difundido e a inoculação com diferentes espécies está sendo estudada.

Nas culturas de soja e feijão, tem sido estudado o uso de *A. brasilense* AbV5 e AbV6, desenvolvido e estudado inicialmente para milho e trigo (HUNGRIA, 2013); *B. subtilis* para outras culturas como leucena (ARAÚJO et al., 2009), espécies arbóreas (SOUCHIE et al., 2005) e milho com outras espécies de micro-organismos (LEGGETT et al., 2014).

Os inoculantes podem atuar de diversas maneiras e, muitas vezes, seu efeito destes é resultado de uma série de mecanismos atuando em conjunto na planta. A promoção do crescimento vegetal, por micro-organismos, ocorre pela produção de metabólitos benéficos às plantas, tais como fitormônios, antibióticos ou sideróforos (RÊGO et al., 2014), solubilização de minerais (KUCEY, 1983; CUNNINGHAM & KUIACK, 1992; WAKELIN et al., 2004; TAKEDA & KNIGHT, 2006; WAKELIN et al., 2007; SOUCHIE et al., 2007; LEGGETT et al., 2014; RAM et al., 2015), antagonismo à fitopatógenos (MARTINEZ-MEDINA et al., 2014), maior exploração do solo e absorção de recursos como nutrientes e água (BAI, 2003; AFZAL, 2010; SOUCHIE, 2010; SOE, 2012; NIMNOI et al., 2014; PRUDENT et al., 2015).

O maior estímulo de crescimento se confunde entre mecanismo e efeito dos inoculantes. Tais efeitos podem ser o aumento de massa seca de plantas e raízes ou do número de nódulos e vagens (AFZAL, 2010), por exemplo. Quando a inoculação ocorre em sementes, esta pode melhorar o índice de germinação e a velocidade de emergência de plântulas, podendo ser aplicado visando aumentar o potencial do crescimento vegetal, resistência a patógenos e tolerância aos estresses

abióticos, como seca, indisponibilidade de nutrientes e salinidade (HERMOSA et al., 2012).

O uso de inoculantes comerciais de diferentes espécies microbianas que beneficiam culturas vegetais de interesse (coinoculação) apresenta eficiência geralmente dependente de fatores como o tipo de substrato e o estágio de desenvolvimento vegetal, no momento da inoculação (MWANGI et al., 2013).

Considerando que o uso de *Bradyrhizobium* em soja é capaz de fornecer o N necessário para o completo desenvolvimento da planta por meio da FBN, parece razoável sugerir que outros micro-organismos possam contribuir de maneiras diversas para o crescimento das plantas, favorecendo seu rendimento. Acreditando que o *Bradyrhizobium* seja essencial para o fornecimento do N, com este trabalho objetivou-se comparar a resposta das plantas de soja submetidas à aplicação de quatro combinações de micro-organismos promotores de crescimento vegetal, em duas safras consecutivas, avaliando-se os componentes morfofisiológicos no estágio V6 das plantas, e seu rendimento no estágio R8.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Caracterização do experimento

Foram conduzidos dois experimentos em safras consecutivas, nos anos de 2014/15 e 2015/16, semeados na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), localizada na Rodovia BR-277, km 175 (divisa com o rio Capivara), localidade de Manhoso, Papagaios Novos, Estrada Velha da Vilinha, no Município de Palmeira, PR (Latitude 25° 25' 44,33" Sul, Longitude 50° 03' 10,80" Oeste e altitude média de 836 metros). O solo, classificado como Cambissolo háplico, apresenta teores de 20 mg.dm⁻³ de P (resina), pH de 5,0 em CaCl₂, 2,9 de K, 44 de Ca, 24 de Mg, CTC de 165,9, saturação por bases (V%) de 43, em mmol_c.dm⁻³ e 22,2 g.dm⁻³ de C.

O Clima na região é subtropical Cfb, segundo Köppen, ou seja, clima temperado propriamente dito. A temperatura média no mês mais frio fica abaixo de 18°C (mesotérmico), com verões frescos, e a temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C, sem estação seca definida. As temperaturas (°C),

precipitação (mm) e evapotranspiração (mm) médias são respectivamente: 18,7 °C, 122 mm e 75 mm no mês de novembro; 20,2 °C, 153 mm e 78 mm em dezembro; 20,7 °C, 206 mm e 68 mm em janeiro; 20,7 °C, 173 mm e 56 mm em fevereiro; 19,7 °C, 128 mm e 61 mm em março e 17,7 °C, 100 e 56 em abril (IAPAR, 2017). O histórico de temperaturas médias máximas, mínimas e precipitação para a região, bem como o regime nas safras estão na tabela 1. Mais informações de temperatura e precipitação estão no apêndice A e B.

Tabela 1 - Temperatura máxima média (°C), temperatura mínima média (°C) e precipitação (mm) nos meses de novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março, nas safras 14/15 e 15/16 na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), e série histórica (1989-2015). Curitiba, 2017.

		Período de cultivo					
		Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Média
Temperatura Máxima Média	Histórico*	24,9	26,3	26,8	26,6	25,7	26,1
	Safra 14/15**	25,1	25,7	28,0	26,1	25,0	26,0
	Safra 15/16**	23,9	25,6	26,6	26,7	25,5	25,6
Temperatura Mínima Média	Histórico	14,7	16,2	16,9	17,1	16,1	16,2
	Safra 14/15	15,3	16,9	18,3	17,5	16,7	16,9
	Safra 15/16	16,2	18,0	17,3	18,6	16,5	17,3
Precipitação	Histórico	121,9	152,8	205,6	172,7	138,3	158,3
	Safra 14/15	237,0	250,0	135,5	249,0	248,0	223,9
	Safra 15/16	173,0	457,5	273,5	295,5	224,0	284,7

FONTE: IAPAR*/EEACG**/ adaptado por BUSO (2017).

6.2.2 Sementes e características

A cultivar BMX Potência apresenta adaptação para a referida região (macrorregião sojícola 1), grupo de maturação 6,7, exige solos férteis, porte alto, peso de mil sementes 168 g, índice de ramificação alto e resistente a acamamento. Como pontos fortes apresenta bom desempenho para abertura do plantio, sendo a data preferencial do plantio para a região entre 25 de outubro e 10 de dezembro, produtividade estável e bom comportamento em áreas úmidas (várzea) (BRASMAX, 2014). Foram utilizadas sementes do cultivar BMX Potência RR que na safra 14/15 tinham peneira 6,0, germinação mínima de 80% e pureza maior que 99,5%, do lote 43023055; e na safra 15/16 tinham peneira 5,5, germinação mínima de 92%, pureza de 100%, do lote 1415-1425.

6.2.3 Ensaios e manejo do cultivo

O plantio do ensaio na safra 15/16 ocorreu 17 dias mais cedo, a avaliação foi em V6, aos 44 dias após o plantio (DAP) na safra 14/15 e aos 43 DAP, na safra seguinte. A colheita foi aos 135 e 149 DAP para o primeiro e segundo ensaios, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Cultivar, data de plantio, data de emergência, adubação de base, formulação de adubação, espaçamento, densidade de plantio, cultura antecessora, data de avaliação e de colheita dos experimentos de soja, conduzidos na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), município de Palmeira, PR, nas safras 2014/15 e 2015/16. Curitiba, PR, 2017.

Safra	14/15	15/16
Cultivar	BMX Potência RR	BMX Potência RR
Data de plantio	26/11/2014	09/11/2015
Emergência	01/12/2014	15/11/2015
Adubação de base	320 kg.ha ⁻¹	320 kg.ha ⁻¹
Formulação NPK	02-20-20	02-20-20
Espaçamento	0,45m	0,45m
Densidade de plantio	19 sem.m ⁻¹	19 sem.m ⁻¹
Cultura antecessora	trigo	trigo
Data da avaliação	09/01/2015	22/12/2015
Estádio da avaliação	V6	V6
Data da colheita	10/04/2015	06/04/2016

FONTE: EEACG/adaptado por BUSO (2017).

O manejo foi realizado de forma a manter as melhores condições de cultivo, utilizando produtos em suas recomendações registradas (apêndice C e D).

6.2.4 Tratamentos e delineamento experimental

Os experimentos foram instalados em blocos inteiramente casualizados com 5 repetições. Foram testados cinco tratamentos que receberam inseticida Imidacloprido (150 g.L⁻¹) e Tiodicarbe (450 g.L⁻¹), na dose de 5 mL.kg semente⁻¹ e fungicida Carbendazim (150 g.L⁻¹) e Tiram (350 g.L⁻¹), na dose de 2 mL.kg⁻¹, que formaram a solução I. Cada um dos micro-organismos (Tabela 3), cujos efeitos foram estudados, foram diluídos em um protetor biológico rico em açúcares (1,4 mL.kg semente⁻¹), estes formaram a solução II, devidamente homogeneizada. Em seguida, foi acrescentado à solução II, o inoculante *B. japonicum* semias 5079 e 5080, de acordo com a dose recomendada (1,2x10⁶ UFC semente⁻¹), formando a solução III. Foram aplicadas sobre as sementes primeiramente a solução I (produtos

químicos) e, posteriormente, a solução III (produtos biológicos). A cada aplicação, as sementes foram agitadas em sacos plásticos inflados para completa homogeneização e secagem dos produtos aplicados.

Tabela 3 - Tratamentos, micro-organismos e doses utilizadas no tratamento de sementes de soja, nos experimentos em campo, conduzidos na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais, município de Palmeira, PR, nas safras 2014/15 e 2015/16. Curitiba, PR, 2017.

Tratamento	Micro-organismo/princípio ativo	Químico	Dose aproximada.semente ⁻¹
T1 ¹	<i>B. japonicum</i> semia 5079 e 5080	sim	1.200.000 UFC ²
T2	T1+ <i>A. brasilense</i> AbV5 e AbV6	sim	23.000 UFC
T3	T1+ <i>T. asperellum</i> T211	sim	1.500.000 Esporos viáveis
T4	T1+ <i>T. virens</i> (GI-3) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (TJ1000)	sim	14.000 e 71.000 ³ UFC
T5	T1+ <i>P. bilaiae</i> P201 e P208	sim	5.000 UFC

¹ - testemunha

² - unidades formadoras de colônias

³ - respectivamente

FONTE: BUSO (2017).

6.2.5 Coletas das amostras

As parcelas continham cinco linhas de dez metros de comprimento espaçadas 0,45 m. Considerou-se como borda as duas linhas laterais e o primeiro e último metro de plantio da parcela. Dentro da área útil das parcelas, coletaram-se dez plantas inteiras em V6, sendo o volume de solo amostrado para retirada das raízes e nódulos de 0,2 m de cada lado da planta, por 0,2 m de profundidade. As raízes das plantas recém-coletadas foram mantidas em água mineral até a realização das análises, que ocorreram em, no máximo, 48h após a coleta.

6.2.6 Análises

No laboratório as estruturas das plantas foram separadas, e determinadas as variáveis. O comprimento de parte aérea foi medido do colo da planta até o ápice de inserção do trifólio apical mais jovem, com o auxílio de uma fita métrica e o comprimento da raiz principal mediu-se do ápice da raiz até a ponta distal da raiz principal. Após a lavagem das raízes, para o número de nódulos na raiz principal foram considerados os nódulos compreendidos a dois virgula cinco centímetros da

raiz principal e cinco centímetros de profundidade, a partir do colo da planta; para o número de nódulos nas raízes secundárias considerou-se os nódulos fora desta região e para nódulos totais, a soma dos dois anteriores. As folhas foram analisadas pelo programa WinFolia Pro 2013a (REGENT INSTRUMENTS, 2014), para determinação do número de folhas e área foliar (cm²).

As raízes foram embebidas em solução alcoólica (50%), colocadas separadamente em sacos plásticos vedados e estes armazenados para posterior análise. As amostras foram então submetidas às análises do programa WinRhizo[®] versão Pro 2013e (REGENT INSTRUMENT, 2013), sendo avaliados, por planta: comprimento total (cm); área projetada (cm²); superfície de contato (cm²); diâmetro médio (mm); volume (cm³); número de pontas; número de forquilhas.

Todas as estruturas das plantas foram secadas em estufa a 65 +/- 4°C, até o peso constante, para determinação da massa seca da parte aérea (g), composta por hastes e folhas com pecíolo; massa seca de raízes (g); massa seca de nódulos na raiz principal (g) e massa seca de nódulos nas raízes secundárias (g).

Foram colhidas três linhas de sete metros da área útil de cada parcela e os grãos tiveram sua umidade aferida e os valores de rendimento corrigidos para 13% de umidade. As médias foram submetidas à análise de variância e, quando indicadas diferenças, foi aplicado o teste SNK ($p \leq 0,05$), com auxílio do programa R (THE R CORE TEAM, 2016).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação entre os fatores safras e tratamentos para as variáveis massa seca de parte aérea, massa seca de raízes, número de nódulos nas raízes secundárias, massa seca de nódulos nas raízes secundárias, comprimento total de raízes, área projetada de raízes, superfície específica de raízes, razão entre comprimento e volume de raízes, número de pontas, número de cruzamentos e índice de área foliar (Tabela 4).

Os resultados indicam que, sob condições ambientais adversas, os micro-organismos teriam induzido à alterações mais significativas nestas variáveis. As raízes seriam estimuladas a crescer no solo sem restrição aparente e teriam vantagem em absorver água e nutrientes num ambiente agrícola. Os micro-

organismos que estimularam mais o crescimento de raízes gerariam plantas mais robustas, com mais capacidade de exploração do solo e absorção de recursos (nutrientes, água, respiração, etc.) (BAI, 2003; AFZAL, 2010; SOUCHIE et al., 2010; SOE, 2012; NIMNOI et al., 2014; PRUDENT et al., 2015). Plantas com recursos disponíveis crescem mais, proporcionando um ciclo virtuoso de crescimento e resposta.

Tabela 4 - Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), número de nódulos nas raízes secundárias (NRS), massa seca de nódulos nas raízes secundárias (MSNRS), comprimento total de raízes (CTR), área projetada de raízes (AP), superfície específica de raízes (SE), número de pontas (P) e índice de área foliar (IAF), interação dos fatores de variação safra e tratamentos, em experimentos de soja conduzidos a campo, na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais, município de Palmeira, PR, nas safras 2014/15 e 2015/16. Curitiba, PR, 2017.

Variável	Safra	Tratamentos					CV(%)
		T1	T2	T3	T4	T5	
MSPA (g.planta⁻¹)	14/15	4,3 aB ¹	4,1 aB	4,9 aA	5,1 aA	5,0 aA	9,6
	15/16	2,6 bA	2,6 bA	2,4 bA	2,6 bA	2,3 bA	
MSR (g.planta⁻¹)	14/15	0,7 aB	0,7 aB	0,8 aA	0,8 aA	0,8 aAB	10,6
	15/16	0,5 bA	0,5 bA	0,5 bA	0,5 bA	0,5 bA	
NRS (nódulos.planta⁻¹)	14/15	25,6 aB	25,2 aB	26,4 bB	35,6 aA	27,6 aB	15,9
	15/16	27,2 aA	27,6 aA	33,4 aA	29,0 bA	26,0 aA	
MSNRS (g.planta⁻¹)	14/15	0,1 aB	0,1 aB	0,1 aB	0,1 aA	0,1 aB	16,8
	15/16	0,1 bA	0,1 bA	0,1 bA	0,1 bA	0,1 bA	
CTR (cm.planta⁻¹)	14/15	603,5 aB	498,2 aC	674,8 aB	759,2 aA	628,3 aB	11,3
	15/16	241,3 bA	275,7 bA	252,8 bA	215,4 bA	238,8 bA	
AP (cm².planta⁻¹)	14/15	35,6 aBC	31,8 aC	40,3 aAB	44,3 aA	38,3 aAB	13,0
	15/16	31,5 aA	31,5 aA	31,8 bA	30,0 bA	33,5 aA	
SE (cm².planta⁻¹)	14/15	111,8 aBC	99,9 aC	126,6 aAB	139,3 aA	120,9 aAB	13,3
	15/16	99,1 aA	99,0 aA	99,9 bA	94,4 bA	105,3 aA	
P	14/15	1718,2 aAB	1485,8 aB	1985,0 aAB	2266,8 aA	1990,8 aAB	24,9
	15/16	1557,6 aA	1609,3 aA	1444,0 bA	1113,9 bA	1422,0 bA	
IAF	14/15	2,7 aC	3,2 aB	2,9 aBC	3,8 aA	3,0 aBC	11,2
	15/16	1,5 bA	1,7 bA	1,7 bA	1,9 bA	1,4 bA	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas, para a mesma variável, não diferem entre si pelo teste SNK (5%).

FONTE: BUSO (2017).

Com o estresse hídrico temporário (seca ou veranico), as plantas mais estimuladas, com raízes mais desenvolvidas, teriam vantagens com relação a plantas menos estimuladas ou micro-organismos menos eficientes. Numa condição

de recursos não escassos, os efeitos seriam menores ou mais dificilmente percebidos. Observando-se o regime pluviométrico do ano safra 15/16 (Tabela 1), constata-se em dezembro chuva 304 mm acima da média histórica, aliada à baixa radiação solar (INMET, 2017), o que pode ter prejudicado o desenvolvimento das plantas neste ano.

Na safra 14/15, sob condições hídricas mais próximas da série histórica (Tabela 1), o tratamento T4 (*B. japonicum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) proporcionou média de 2.433,00 Kg.ha⁻¹. Mesmo sem diferença, quando comparado às outras médias, é aproximadamente 100 Kg acima da média do T1 naquele ano. Esta ideia é reforçada pelos valores apresentados (Tabela 4), para todas as variáveis estudadas neste período, em especial para nódulos nas raízes secundárias, massa seca de nódulos nas raízes secundárias, comprimento de raízes e índice de área foliar, em que o tratamento T4 foi superior aos demais.

A falta de água ou a baixa eficiência do seu uso é a principal causa de redução de produtividade no Brasil, em especial na região Sul, onde a radiação é maior no período de cultivo de verão (SENTELHAS, 2015). Neste sentido, os micro-organismos e combinações que tenham efeito em condições severas de clima podem ser uma ferramenta adequada de manejo para aumento de rendimento (ELKOCA et al., 2010).

Os tratamentos T1 (*B. japonicum*), T4 (*B. japonicum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) e T5 (*B. japonicum* e *P. bilaiae*) foram superiores ao tratamento T2 (*B. japonicum* e *A. brasilense*) para a variável número de nódulos na raiz principal (Tabela 5). Tal variável foi beneficiada pela coinoculação em plantas avaliadas com 14 dias em condições controladas de cultivo (CASSÁN et al., 2009). A queda de nodulação pode ser percebida também para nódulos totais (variável dependente de nódulos na raiz principal), mas sem diferença, e para massa seca de nódulos na raiz principal, onde o T4 (*B. japonicum*, *T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) foi superior ao T2 (*B. japonicum* e *A. brasilense*).

A redução do número de nódulos na raiz principal e totais pode não afetar a FBN a ponto de reduzir o potencial produtivo, pois, neste nível de nodulação, há capacidade de entregar todo o N necessário para o desenvolvimento da planta. Nestas condições, pode ocorrer também aumento na taxa de N fixado por nódulo (SUBRAMANIAN et al., 2015). Por outro lado, parece haver relação entre aumento do desenvolvimento de raízes e melhoria da nodulação com promoção de

crescimento e a coinoculação de soja com *B. japonicum* e *Bacillus* spp. (BAI et al., 2003).

Tabela 5 – Estatura de plantas (H), comprimento da raiz principal (CRP), número de nódulos na raiz principal (NRP), número de nódulos totais (NT), massa seca de nódulos na raiz principal (MSNRP), diâmetro médio (D), volume de raízes (V), número de folhas (NF), área foliar por planta (AF) em V6, e rendimento (Rend.) de soja, para os fatores de variação e tratamentos, ensaios realizados a campo, nas safras 14/15 e 2015/16, na Estação Experimental Agrícola Campos Gerais (EEACG), no município de Palmeira, PR. Curitiba, 2017.

Fator de variação		H (cm.planta ⁻¹)	CRP (cm.planta ⁻¹)	NRP (planta ⁻¹)	NT (planta ⁻¹)	MSNRP (g.planta ⁻¹)
Safr	14/15	35,4 b	24,0 a	25,2 a	53,3 a	0,16 a
	15/16	37,8 a	15,7 b	20,3 b	48,9 b	0,14 b
Tratamento	1 -Bj	37,8	21,2	23,1 a	49,5 ab	0,15 ab
	2 -Ab	35,9	19,2	19,6 b	46,0 b	0,14 b
	3 -Ta	36,2	19,6	22,3 ab	52,2 ab	0,15 ab
	4 -TvBa	36,5	19,5	24,6 a	56,9 ab	0,17 a
	5 -Pb	36,6	19,8	24,1 a	50,9 ab	0,15 ab
Coeficiente de Variação (%)		7,5	8,4	13,8	12,2	11,4
		D (mm.planta ⁻¹)	V (cm ³ .planta ⁻¹)	NF (planta ⁻¹)	AF (cm ² .planta ⁻¹)	Rend. (kg.ha ⁻¹)
Safr	14/15	0,6 b	1,8 b	9,2	768,4 a	2378,9 b
	15/16	1,4 a	3,7 a	9,0	376,6 b	3102,2 a
Tratamento	1 -Bj	1,0	2,7	7,9 c	545,8 b	2750,5 ab
	2 -Ab	1,0	2,5	8,7 bc	550,6 b	2748,5 ab
	3 -Ta	1,0	2,7	9,9 ab	608,6 a	2598,2 b
	4 -TvBa	1,0	2,9	10,3 a	637,5 a	2748,0 ab
	5 -Pb	1,1	3,0	8,6 bc	520,1 b	2857,7 a
Coeficiente de Variação (%)		18,9	29,4	14,7	8,8	6,0

Médias seguidas da mesma letra na coluna, dentro do mesmo fator, não diferem entre si pelo teste SNK (5%).

FONTE: BUSO (2017).

Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos com *B. japonicum* e *B. japonicum* + *A. brasilense* para as variáveis número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca de plântulas, em um experimento com soja, realizado em duas safras e em dois locais (HUNGRIA et al., 2015), corroborando as informações do presente trabalho. Similarmente, em soja e feijão, a coinoculação com *A. brasilense* apresentou resposta em rendimento para a região de Ponta Grossa, mas não para a região de Londrina, independente da safra (HUNGRIA et al., 2013). Outros benefícios da coinoculação com *A. brasilense* foram o aumento da velocidade de emergência, do estande de plantas, do número e massa seca de

nódulos, do volume de raízes e do rendimento de soja, além de outras variáveis analisadas (BELLONE et al., 2011).

O tratamento T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) foi diferente do tratamento T2 (*A. brasilense*) para massa seca de nódulos na raiz principal, confirmando que tal tratamento pode propiciar bom desenvolvimento das bactérias e possivelmente melhorar a capacidade de FBN nas condições estudadas. O aumento da massa fresca de nódulos foi observado com a aplicação de três cepas de *Bacillus* spp. coinoculando com *Rizobium* spp., em feijão guandu (*Cajanus cajan*), confirmando a eficiência deste tratamento (RAJENDRAN et al., 2007).

Para a variável número de folhas, o tratamento T4 (*T. virens* e *B. amyloliquefaciens*) foi superior aos tratamentos T1 (*B. japonicum*), T2 (*A. brasilense*) e T5 (*P. bilaiae*). O mesmo aconteceu para a área foliar, mas, para esta variável, o T3 (*T. asperellum*) também foi superior a estes três tratamentos. O *Trichoderma* tem efeito antagonista, biocontrolador e de promoção de crescimento, capaz de aumentar o comprimento de raízes, comprimento de parte aérea, área foliar, massa seca de parte aérea e raízes (ENTESARI et al., 2013).

Os micro-organismos *B. japonicum* e *P. bilaiae* (T5) parecem ter estimulado a planta de maneira a proporcionar um crescimento equilibrado de suas partes e tal equilíbrio parece ter sido fundamental para a resposta em rendimento. Ao relacionar a área foliar e o número de folhas, constata-se que este tratamento apresentou as menores áreas foliares por folha (razão calculada com os dados da Tabela 4), sendo 12% menores que o tratamento T1.

A coinoculação de *B. japonicum* e a bactéria solubilizadora de fósforo (P) *Pseudomonas* incrementou o rendimento da cultura em 12%, bem como o P disponível no solo e variáveis como massa seca de plantas e raízes, número de nódulos e vagens, por exemplo (AFZAL et al., 2010). A solubilização de P inorgânico é a forma de ação mais estudada do *P. bilaiae* (KUCEY, 1983; CUNNINGHAM & KUIACK, 1992; WAKELIN et al., 2004; TAKEDA & KNIGHT 2006; WAKELIN et al., 2007; SOUCHIE et al., 2007; SOUCHIE et al., 2010; RAM et al., 2015), e pode ter ajudado a melhorar o rendimento do T5 (*B. japonicum* e *P. bilaiae*). Ganhos consistentes de produtividade foram encontrados em milho, especialmente em solos com baixa disponibilidade de P, com a inoculação de *P. bilaiae* (LEGGETT et al., 2014).

6.4 CONCLUSÕES

Neste ensaio, as respostas das variáveis massa seca de parte aérea, massa seca de raízes, número de nódulos nas raízes secundárias, massa seca de nódulos nas raízes secundárias, comprimento total de raízes, área projetada de raízes, superfície específica de raízes, número de pontas e índice de área foliar foi observada no ano com disponibilidade hídrica inferior.

Com base nos estudos realizados, é possível concluir que as diferentes combinações de micro-organismos estimulam o crescimento de diferentes variáveis e condições estudadas, podendo ser utilizados como coinoculantes.

O cultivo da soja é estimulado pelo uso de micro-organismos coinoculados nas sementes, apresentando resposta de aumento de rendimento quando combinado *P. bilaiae* com *B. japonicum*.

6.5 REFERÊNCIAS

- AFZAL, A.; BANO, A.; FATIMA, M.. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. *Agronomy for Sustainable Development*, v 30, p 487-495, 2010. Disponível em: www.agronomy-journal.org; Acessado em: 26/02/2017. DOI:10.1051/agro/2009041
- ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F.. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, online. 2009. ISSN 0103-8478
- BAI, Y.; ZHOU, X.; SMITH, D. L.. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Science**, v. 43, p. 1774–1781, 2003.
- BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; CORDILEONE, V.. Related growth parameters in soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Crop Improvement**, v. 25, p. 472–487, 2011. DOI: 10.1080/15427528.2011.583716
- BRASMAX. Cultivares recomendados para a região sul. Disponível em: <http://brasmaxgenetica.com.br/>; acessado em: 16/07/2014.
- CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O; PENNA, C.; LUNA, V.. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v.45, p. 28 – 35, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Décimo Primeiro Levantamento - Safra 2016/17**, v. 4, n. 11, p.115-119, agosto 2017. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 19 ago 2017.
- CUNNINGHAM, J. & KUIACK, C. Production of Citric and Oxalic Acids and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1451-1458, 1992.
- ELKOCA, E.; TURAN, M.; DONMEZ, M. F.. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*phaseolus vulgaris* L. Cv. 'elkoca-05') **Journal of Plant Nutrition**, v. 33, p. 2104-2119, 2010. DOI: 10.1080/01904167.2010.519084.
- ENTESARI, M.; SHARIFZADEH, F.; AHMADZADEH, M.; FARHANGFAR, M.. Seed biopriming with *Trichoderma* Species and *Pseudomonas fluorescent* on growth parameters, enzymes activity and nutritional status of soybean. **International Journal of Agronomy and Plant Production**. V. 4, p. 610-619, 2013.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E.. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p.17-25, 2012. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/>>. Acesso em: 22 abr. 2016. doi: 10.1099/mic.0.052274-0.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R.. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Micro-organismos de importância agrícola**, Brasília: Embrapa - SPI., p.9-89. 1994.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**. v.49,n.7, p 791-801, out 2013. Disponível em: <http://link.springer.com>, acesso em: 22 abr 2016. Doi 10.1007/s00374-012-0771-5

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.. Soybean seed co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6,p. 811-817, 2015.<http://www.scirp.org/journal/ajps> <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ (IAPAR), 2017. Disponível em: <http://www.iapar.br/>; acessado em 19/02/2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET), 2017. Disponível em: www.inmet.gov.br/; acessado em 10/02/2017.

KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 63, p. 671–678, 1983.

LEGGETT, M.; NEWLANDS, N. K.; GREENSHIELDS, D.; WEST, L.; INMAN, S.; KOIVUNEN, M. E.. Maize yield response to a phosphorus-solubilizing microbial inoculant in field trials. **Journal of Agricultural Science**, p. 1 - 15, 2014. doi:10.1017/S0021859614001166.

MARTÍNEZ-MEDINA A., ALGUACIL M. D. M., PASCUAL J. A., VAN WEES S. C. M.. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. **Journal of Chemical Ecology**. v. 40 p. 804–815, 2014. DOI: 10.1007/s10886-014-0478-1.

MWANGI, A. M. K.; KAHANGI, E. M.; ATEKA, E.; ONGUSO, J.; MUKHONGO, R. W.; MWANGI, E. K.; JEFWA, J. M.. Growth effect of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p.152-162, 2013. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/apsoil>. Acesso em: 22 abr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.002>.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S.. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with *actinomyces* and *bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, p. 432–446, 2014 ISSN: 0190-4167 print / 1532-4087 online DOI: 10.1080/01904167.2013.864308.

PRUDENT, M., SALON, C., SOULEIMANOV, A.; EMERY, R. J. N.; SMITH, D. L.. Soybean is less impacted by water stress using *Bradyrhizobium japonicum* and thuricin-17 from *Bacillus thuringiensis*. **Agronomy for Sustainable Development**; v. 35, p. 749–757, 2015. DOI 10.1007/s13593-014-0256-z

RAJENDRAN, A.; SING, F. DESAI, A. J.; ARCHANA, G.. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. **Bioresource Technology**, n. 99, p.4544–4550, 2007. Doi:10.1016/j.biortech.2007.06.057

RAM, H.; MALIK, S.S.; DHALIWAL, S. S.; KUMAR, B.; SINGH, Y.. Growth and productivity of wheat affected by phosphorus-solubilizing fungi and phosphorus levels. **Plant Soil and Environment**, v.61, p. 122-126, 2015.

REGENT INSTRUMENTS CANADA INC. **WinRHIZO manual for root measurement**. Ver Pro, 2013e. 2013.

REGENT INSTRUMENTS CANADA INC. **WinFolia manual for leaf measurement**. Ver 2013a. 2014.

RÊGO, M. C. F.; ILKIU-BORGES, F.; FILIPPI, M. C. C.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, G. B.. Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. **Journal of Botany**, v. 2014, p.10, 2014, ID 818797. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/818797>>.

SENTELHAS, P. C.; BATTISTI, R.; CÂMARA, G. M. S.; FARIAS, J. R. B.; HAMPF, A. C.; NENDEL, C.. The soybean yield gap in Brazil – magnitude, causes and possible solutions for sustainable production. **Journal of Agricultural Science**, p. 1 – 18, 2015 doi:10.1017/S0021859615000313.

SOE, K. M.; BHROMSIRI, A.; KARLADEE, D.; YAMAKAWA, T.. Effects of endophytic *actinomyces* and *Bradyrhizobium japonicum* strains on growth, nodulation, nitrogen fixation and seed weight of different soybean varieties **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 58, p. 319-325, 2012. <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2012.682044>

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, v. 35, n. 2, 2005.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SILVA, E. M. R.; SAGGIN-JÚNIOR, O. G.. Enhancement of clover growth by inoculation of P-solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizal fungi. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p.771-777, 2010. Trabalho apresentado na Academia Brasileira de Ciências. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652010000300023>>.

SUBRAMANIAN, P.; KIM, K.; KRISHNAMOORTHY, R.; SUNDARAM, S.; SA, T.. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 76, p. 327–332, 2015. DOI 10.1007/s10725-014-9993-x.

TAKEDA M.; KNIGHT J.D.. Solubilization of rock phosphate by *Penicillium bilaiae*–soil phosphorus management in organic crop production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1121-9, 2006.

THE R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **Reference Index**, version 3.3.2, 2016. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

THILAKARATHNA, M. S.; RAIZADA, M. N.. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 105, p. 177-196, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.022>

WAKELIN, S. A.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R.; RYDER, M. H.. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 40, p. 36-43, 2004.

WAKELIN, A.; GUPTA, V. V. S. R.; HARVEY, R.; AND RYDER, M. H.. The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 106–115, 2007.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo apresentamos uma série de resultados e, em geral, buscamos respostas dos tratamentos em aumentar as variáveis analisadas. Entretanto, entendemos que, nem sempre, o maior é melhor. Cabe reflexão sobre a eficiência das estruturas das plantas, que pode ser afetada pela aplicação dos inoculantes estudados, através dos diferentes estímulos comentados no texto. Plantas mais eficientes precisariam de menores estruturas para realizar a mesma fotossíntese que plantas maiores, pouco ou menos eficientes.

Observamos ao longo de todo o trabalho uma série de respostas aos estímulos dos inoculantes, nos diversos ambientes estudados; ainda assim, parece baixa a resposta em rendimento. Desde o plantio, e inoculação ou coinoculação, até a colheita, foram mais de 120 dias, e muito pode ocorrer durante este período, influenciando a resposta de rendimento, especialmente numa cultura como a soja, que suporta grande alteração na sua população e desfolha, por exemplo, sem oscilações de rendimento.

Mesmo em ensaios pequenos, o campo apresenta variabilidade que impossibilita a determinação das diferenças entre os tratamentos com poucos ensaios, especialmente em ambientes complexos como ambiente agrícola. Maior número de ensaios precisaria ser conduzido para comprovar o efeito dos micro-organismos nas diferentes variáveis analisadas.

Além do rendimento, outras variáveis importantes foram estudadas, e poderiam ser agronomicamente exploradas, de acordo com a necessidade do produtor na região em questão. Tais micro-organismos podem entregar valor ao cultivo afora rendimento, seja estimulando ou melhorando outras variáveis não estudadas aqui, como fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo no sistema, ou controlando uma praga e/ou doença potencial.

Não era objetivo do trabalho o estudo do efeito de diferentes safras nos tratamentos, mas fica evidente a melhora de algumas variáveis em condições de cultivo com restrição hídrica (14/15), safra onde houve diferença entre os tratamentos para maior número de variáveis. Isso poderia indicar que os inoculantes e/ou coinoculantes serviriam de “seguro” para a plantação, em safras com tais restrições, eles ajudariam as plantas a tolerar melhor os estresses hídricos, e quem sabe outros.

As interações na agricultura tornam-se mais complexas a medida que passamos a conhecer e entender bem as interações menores, avançamos cientificamente. Neste intuito, os estudos sobre as interações de plantas, coinoculantes e ambientes precisam avançar, muito mais do que estudar os indivíduos isoladamente, precisamos entender as interações, a complexidade do sistema, a dinâmica do cultivo de soja. Afim de que consigamos compreender melhor seus efeitos, potenciais e valores, outros estudos precisam ser realizados para confirmar o efeito dos micro-organismos, e seu real potencial.

8 REFERÊNCIAS

- AFZAL, A.; BANO, A.; FATIMA, M.. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. *Agronomy for Sustainable Development*, v 30, p 487-495, 2010. Disponível em: www.agronomy-journal.org; Acessado em: 26/02/2017. DOI:10.1051/agro/2009041.
- ANSTIS S. T.. *Penicillium radicum*: Studies on the mechanisms of growth promotion in wheat. **Tese de doutorado**, School of Earth and Environmental Sciences, University of Adelaide, Australia. 2004.
- ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F.. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, online. 2009. ISSN 0103-8478
- ARGUESO C.T.; HANSEN M.; KIEBER J.. Regulation of ethylene biosynthesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, n. 26, p. 92–105, 2007.
- BAI, Y.; ZHOU, X.; SMITH, D. L.. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Science**, v. 43, p. 1774–1781, 2003.
- BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; CORDILEONE, V.. Related growth parameters in soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Crop Improvement**, v. 25, p. 472–487, 2011. DOI: 10.1080/15427528.2011.583716.
- BERG G.. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 84, p. 11–18, 2009.
- BIRÓ, B.; KÖVES-PÉCHY, K.; VÖRÖS, I.; TAKÁCS, T.; EGGENBERGER, P.; STRASSER, R.J.. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 159–168, 2000.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.
- BRASMAX. Cultivares recomendados para a região sul. Disponível em: <http://brasmaxgenetica.com.br/>; acessado em: 16/07/2014.
- CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; BOARO, C. S. F.; RODRIGUES, J. D.. Análise de crescimento em plantas de soja tratadas com substâncias reguladoras. **Biotemas**, v. 21, n.3, p. 53-63, setembro de 2008. ISSN 0103 – 1643
- CARVALHO FILHO, M. R.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P.; MENÊZES, J. E. Avaliação de Isolados de *Trichoderma* na Promoção de Crescimento, Produção de Ácido Indolacético *in vitro* e Colonização Endofítica de Mudas de Eucalipto. **Boletim**

de Pesquisa e Desenvolvimento 226. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. ISSN 1676-340

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.:** cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.61-86.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V.. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology.** v. 45, p. 28 – 35, 2009. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005

CHOWDAPPA, P.; MOHAN KUMAR, S.P.; JYOTHI LAKSHMI, M.; UPRETI, K.K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control** v. 65, p. 109–117, 2013.

CLAWSON, K. L.; SPECHT, J. E.; BLAD, B. L.. Growth Analysis of Soybean Isolines Differing in Pubescence Density. **Agronomic Journal.** v. 78, p. 164-172, 1986.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Décimo Primeiro Levantamento - Safra 2016/17**, v. 4, n. 11, p. 115-119, agosto 2017. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 19 ago 2017.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.:** cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.87-95.

CRUZ, T. V.; PEIXOTO, C. P.; MARTINS, M. C.. Crescimento e produtividade de soja em diferentes épocas de semeadura no oeste da Bahia. **Scientia Agraria**, v.11, n.1, p.033-042, Jan./Feb. 2010.

CUNNINGHAM, J & KUIACK, C. Production of Citric and Oxalic Acids and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 58, p. 1451-1458, 1992.

DARDANELLI, M. S.; CORDOBA, F. J. F.; ESPUNY, M. R.; CARVAJAL, M. A. R.; DIAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y.; MEGIAS, M.. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress **Soil Biology and Biochemistry.** v. 40, p. 2713–2721, 2008. doi:10.1016/j.soilbio.2008.06.016

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/Technology**, v.6, p.282- 286, 1988.

DENTON B. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. MMG 445 **Basic Biotechnology**, n. 3, p. 1–5, 2007.

DESBROSSES G.; CONTESTO C.; VAROQUAUX F.; GALLAND M.; TOURAINE B.. PGPR–*Arabidopsis* interactions is a useful system to study signalling pathways involved in plant developmental control. **Plant Signal Behavior**, n.4, p. 321–323, 2009.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.155-166, 2008.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.T. (Ed.) **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION**, vol. 2. **Proceedings...** Pullman, USA: Washington State University Press, 1976. p.518-538.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.1464–1473, 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Science Tech, Springer Verlag, Madison, USA, 1987. p. 1-155. (Brock/Springer series in contemporary bioscience)

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFLES, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, pt. 1, p. 17-26, 2001.

EL ZEMRANY, H., CZARNES, S., HALLETT, P.D. et al. Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. **Plant and Soil**. v. 291, p. 109-118, 2007. doi:10.1007/s11104-006-9178-0

ELKOCA, E.; TURAN, M.; DONMEZ, M. F.. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*phaseolus vulgaris* L. Cv. 'elkoca-05') **Journal of Plant Nutrition**, v. 33, p. 2104-2119, 2010. DOI: 10.1080/01904167.2010.519084.

ENTESARI, M.; SHARIFZADEH, F.; AHMADZADEH, M.; FARHANGFAR, M.. Seed Biopriming with *Trichoderma* Species and *Pseudomonas fluorescent* on Growth Parameters, Enzymes Activity and Nutritional Status of Soybean. **International Journal of Agronomic Plant Production**. v. 4, p. 610-619, 2013.

FARIAS, J. R. B., NEPOMUCENO, A. L., NEUMAIER, N.. Fisiologia da soja. **Circular Técnica 48**. Embrapa Soja, Londrina – PR, 2007. ISSN 1516-7860.

FERNEDA, B. G.; BOEING, E.; SILVA, A. C.; SOUZA, A. P.; SILVA, S. G.; MARTIM, C. C.; PALADINO, F. G.; TANAKA, A. A.. Graus-dias na estimativa das taxas de crescimento de quatro cultivares de soja em diferentes épocas de plantio. **Nativa**, v.4, n.3, p.121-127, mai./jun. 2016. DOI: 10.14583/2318-7670.v04n03a01.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C.; ARAUJO, F. F.; STAMFORD, N. P. Beneficial Microorganisms: Current Challenge to Increase Crop Performance. In: Arora, N.K., et al. (eds.), **Bioformulations: for Sustainable Agriculture**, p 54 – 65, 2016. Springer India DOI 10.1007/978-81-322-2779-3_3

FIGUEROLA, E. L. M., GUERRERO, L. D., TÜRKOWSKY, D., WALL, L. G., AND ERIJMAN, L.. Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. **Environmental Microbiology**, 2014, doi:10.1111/1462-2920.12497,.

GLICK B.R.; CHENG Z.; CZARNY J.; DUAN J.. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, n. 119, p. 329–339, 2007.

GLICK B.R.. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, n. 2012, p. 1–15, 2012. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.

GONG, M.; DU, P.; LIU, X. ZHU, C.. An effective method for screening and testing the true phosphate-solubilizing fungus that enhances corn growth. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, p. 60-70, ago 2014. ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760.

GULDEN, R. H. & VESSEY, J.K. *Penicillium bilaii* inoculation increases root-hair production in field pea. **Canadian Journal of Plant Science**. v. 80, p. 801-804, 2000.

HARMAN, G. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**. v. 189, p. 647-649, Feb. 1, 2011. ISSN: 0028646X.

HASANAH, Y.; NISA, T. C.; HAPSOH; HANUM, H.. Growth Analysis of Soybean Varieties at Dry Land With Application of Nitrogen Sources. **International Journal of Scientific and Technology Research**. v. 3, n. 6, junho de 2014. ISSN 2277-8616.

HEIFFIG, L. S.; CÂMARA, G. M. S.; MARQUES, L. A.; PEDROSO, D. B.; PIEDADE, S. M. S.. Fechamento e índice de área foliar da cultura da soja em diferentes arranjos espaciais. **Bragantia**, v.65, n.2, p.285-295, 2006.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E.. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p.17-25, 2012. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/>>. Acesso em: 22 abr. 2016. doi: 10.1099/mic.0.052274-0.

HOAGLAND D.R., ARNON D.Y. **The water culture method for growing plants without soil**, California Agricultural Experimental Station, University of California - Berkeley. Circ 347, 1950.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008. p.17-35.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R.. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Micro-organismos de importância agrícola**, Brasília: Embrapa - SPI., p.9-89. 1994.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283).

HUNGRIA, M. **Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Embrapa Soja. Documentos, 325). (ISSN 1516-781X; N 325).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R.S.. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p791-801, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00374-012-0771-5>>. Acesso em: 22 abr. 2016. doi: 10.1007/s00374-012-0771-5.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.. Soybean seed co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6,p. 811-817, 2015.<http://www.scirp.org/journal/ajps>
<http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ (IAPAR), 2017. Disponível em: <http://www.iapar.br/>; acessado em 19/02/2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET), 2017. Disponível em: www.inmet.gov.br/; acessado em 10/02/2017.

KARAMANOS, R. E.; FLORE N. A. & HARAPIAK, J. T. Re-visiting Use of *Penicillium bilaii* with phosphorus fertilization of hard red spring wheat. **Canadian Journal of Plant Science**. v. 90, p. 265-277, 2010.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**. v.7, p.39-43, 1989.

KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 63, p. 671–678, 1983.

LEGGETT, M.; NEWLANDS, N. K.; GREENSHIELDS, D.; WEST, L.; INMAN, S.; KOIVUNEN, M. E.. Maize yield response to a phosphorus-solubilizing microbial inoculant in field trials. **Journal of Agricultural Science**, p. 1 - 15, 2014. doi:10.1017/S0021859614001166.

LIBÓRIO, P. H. S.; BÁRBARO-TORNELI, I. M.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; NÓBILE, F. O.; MIGUEL, F. B.; SILVA, F. M.. Interação entre cultivares, bactérias e micronutrientes na germinação e desenvolvimento inicial de soja. **Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 1, 2016.

LOBO JUNIOR, M.; BRANDÃO, R. S.; GERALDINE, A. M.. Produtividade do Feijoeiro Comum, em Campo, em Tratamentos com *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*. **Comunicado técnico 184**, 2009. ISSN 1678-961X

LORITO, M.; WOO, S. I.; HARMAN, G. E.; MONTE, E.. Translational Research on *Trichoderma*: **Field Annual Review of Phytopathology**. v. 48, p. 395-417, 2010.

LUGTENBERG B.; KAMILOVA F.. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Reviews Microbiology**, n. 63, p. 541–556, 2009.

MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. São Paulo, EPU, 1985. V.1, p.331 - 351.

MANDAL, K.G.; WANRONG, G.; CAI, Z. M.; DUAN, L.; LI, Z.. Effect of nutrient- N, P and K starvation on root growth of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seedlings **Ecology, Environment and Conservation**. v. 20, p. 459-466, 2014.

MARTÍNEZ-MEDINA A., ALGUACIL M. D. M., PASCUAL J. A., VAN WEES S. C. M.. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. **Journal of Chemical Ecology**. v. 40 p. 804–815, 2014. DOI: 10.1007/s10886-014-0478-1.

MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V.. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation **Microbiological Research**. v. 169, p. 609–615, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.001>.

MOREIRA, E. N.; PAUL, O. A.; RODRIGUEZ, F. A., JESUS, W. C.. Temporal dynamics of soybean rust associated with leaf área index in soybean cultivars of different maturity groups. **Plant Disease**. v. 99, n. 9, p. 1216-1226, 2015. [HTTP://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-14-1029-RE](http://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-14-1029-RE).

MURRAY J.D.. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular Plant Microbe Interaction*, n. 24, p. 631–639, 2011.

MWANGI, A. M. K.; KAHANGI, E. M.; ATEKA, E.; ONGUSO, J.; MUKHONGO, R. W.; MWANGI, E. K.; JEFWA, J. M.. Growth effect of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p.152-162, 2013. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/apsoil>. Acesso em: 22 abr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.002>.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S.. Coinoculation of soybean (*Glycine max*) with *Actinomycetes* and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, p. 432-446, 2014. DOI: 10.1080/01904167.2013.864308

PARNELL, J. J.; BERKA, R.; YOUNG, H. A.; STURINO, J. M.; KANG, Y.; BARNHART, D. M.; DILEO, M. V.. From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. **Frontiers in Plant Science**. 7:1110, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01110

PATTEN, C. L. & GLICK, B. R.. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid indevelopment of the host plant root system. **Applied Environmental Microbiology**. v. 68, p. 3795-3801, 2002.

PEIXOTO, C. P.; CRUZ, T. V.; PEIXOTO, M. F. S. P.. **Análise Quantitativa do Crescimento de Plantas: Conceitos e Prática** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, vol.7, n.13, p. 51-76, 2011.

PEREG, L. & MCMILLAN, M.. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biology and Biochemistry**. n. 80, p. 349–358, 2015.

PEREIRA, C. R. Análise do crescimento e desenvolvimento da cultura de soja sob diferentes condições ambientais. **Tese em Engenharia Agrícola**, UFV, p. 282, 2002.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R.A.; DEL CERRO, P.; ESPUNY, M.R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; OLLERO, F.J.; CUBO. T.. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research** n. 169, p. 325–336, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

PORTUGAL, J. R.; ARF, O.; LONGUI, W. V.; GITTI, D. C.; BARBIERI, M. K. F.; GONZAGA, A. R.; TEIXEIRA, D. S.. Inoculação com *Azospirillum brasilense* via foliar associada à doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho XXIX **CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO** - Águas de Lindóia - 26 a 30 de agosto de 2012.

PRUDENT, M., SALON, C., SOULEIMANOV, A.; EMERY, R. J. N.; SMITH, D. L.. Soybean is less impacted by water stress using *Bradyrhizobium japonicum* and thuricin-17 from *Bacillus thuringiensis*. **Agronomy for Sustainable Development**, v 35, p.749-757, 2015. Disponível em:< <http://link.springer.com/>>. Acesso em: 20 fev. 2017. doi: 10.1007/s13593-014-0256-z.

RAHMAN K.S.; RAHMAN T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY P.; BANAT I.M.. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. **Journal of Basic Microbiology**, n. 42, p. 284–291, 2002.

RAJENDRAN, A.; SING, F. DESAI, A. J.; ARCHANA, G.. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. **Bioresource Technology**, n. 99, p.4544–4550, 2007. Doi:10.1016/j.biortech.2007.06.057.

RAM, H.; MALIK, S.S.; DHALIWAL, S. S.; KUMAR, B.; SINGH, Y.. Growth and productivity of wheat affected by phosphorus-solubilizing fungi and phosphorus levels. **Plant Soil and Environment**, v.61, p. 122-126, 2015.

REEVE, J., SCHADT, C., CARPENTER-BOGGS, L., KANG, S., ZHOU, J., AND REGANOLD, J. P.. Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. **International Society for Microbial Ecology Journal**, n. 4, p. 1099–1107, 2010.

REGENT INSTRUMENTS CANADA INC. **WinRHIZO Manual**, for root measurement. Ver Pro, 2013e. 2013.

REGENT INSTRUMENTS CANADA INC. **WinFolia manual for leaf measurement**. Ver 2013a. 2014.

RÊGO, M. C. F.; ILKIU-BORGES, F.; FILIPPI, M. C. C.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, G. B.. Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. **Journal of Botany**, v. 2014, p.10, 2014, ID 818797. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/818797>>.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.

SENTELHAS, P. C.; BATTISTI, R.; CÂMARA, G. M. S.; FARIAS, J. R. B.; HAMPF, A. C.; NENDEL, C.. The soybean yield gap in Brazil – magnitude, causes and possible solutions for sustainable production. **Journal of Agricultural Science**, p. 1 – 18, 2015 doi:10.1017/S0021859615000313.

SHORESH, M., MASTOURI, F., HARMAN, G. E. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**. v.48, p. 21–43, 2010.

SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M.. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos: **Documentos 241**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

SILVA, L. H. C. P.; VALIATI, V. A. H.; CAMPOS, H. D.; SILVA, J. R. C.. Efeito *in vitro* e *in vivo* de fungicidas no desenvolvimento de espécies de *Trichoderma*. **CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**. Cuiabá, 2010.

SOE, K. M.; BHROMSIRI, A.; KARLADEE, D.; YAMAKAWA, T.. Effects of endophytic actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* strains on growth, nodulation, nitrogen fixation and seed weight of different soybean varieties **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 58, p. 319-325, 2012. <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2012.682044>

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, v. 35, n. 2, 2005.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SILVA, E. M. R.; SAGGIN-JÚNIOR, O. G.. Enhancement of clover growth by inoculation of P-solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizal fungi. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p.771-777, 2010. Trabalho apresentado na Academia Brasileira de Ciências. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652010000300023>>.

SOUZA, J. E. B. & FERREIRA, E. P. B.. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 237, p. 250–257, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.040>

SPAEPEN S.; VANDERLEYDEN J.; REMANS R.; Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 31, p. 425–448, 2007.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 12e. 2013. **Manual de instruções**. www.statsoft.com

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a freeliving nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Chichester, v. 24, n. 4, p. 487-506, 2000.

STEFAN, M.; MUNTEANU, N.; STOLERU, V.; MIHASAN, M.; HRITCU, L. Seed inoculation with plant growth promotion rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 22-29, 2013.

STERFLINGER, K.. Fungi as geologic agents. **Geomicrobiology Journal**, v. 17, p. 97-124, 2000.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v.149, p.55-60, 1994.

SUBRAMANIAN, P.; KIM, K.; KRISHNAMOORTHY, R.; SUNDARAM, S.; SA, T.. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 76, p. 327–332, 2015. DOI 10.1007/s10725-014-9993-x.

SWARNALAKSHMI K., PRASANNA R., KUMAR A., PATTNAIK S., CHAKRAVARTY K., SHIVAY Y.S.. Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. **European Journal of Soil Biology**, n.55, p. 107–116, 2013.

TAKEDA M.; KNIGHT J.D.. Solubilization of rock phosphate by *Penicillium bilaiae*—soil phosphorus management in organic crop production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1121-9, 2006.

THE R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **Reference Index**, version 3.3.2, 2016. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

THILAKARATHNA, M. S.; RAIZADA, M. N.. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 105, p. 177-196, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.022>

THONAR, C.; LEKFELDT, J. D. S.; COZZOLINO, V.; KUNDEL, D.; KULHÁNEK, M.; MOSIMANN, C.; NEUMANN, G.; PICCOLO, A.; REX, M.; SYMANCZIK, S.; WALDER, F.; WEINMANN, M.; NEERGAARD, A.; MÄDER, P.. Potential of three microbial bio-effectors to promote maize growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. **Chemistry, Biology and Technology Agriculture**. v. 4, 2017. DOI 10.1186/s40538-017-0088-6

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

TSIGIE, A.; TILAK, K. V. B. R.; SAXENA, A.K. Field response of legumes to inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, p.971-974, 2011. doi: 10.1007/s00374-011-0573-1.

VERMA JP, YADAV J, TIWARI KN, LAVAKUSH, SINGH V.. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. **International Journal of Agriculture Research**, n. 5, p. 954–983, 2010.

WAKELIN, S. A.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R.; RYDER, M. H.. Phosphate solubilisation by *Penicillium* species closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**. v. 40, p. 36-43, 2004.

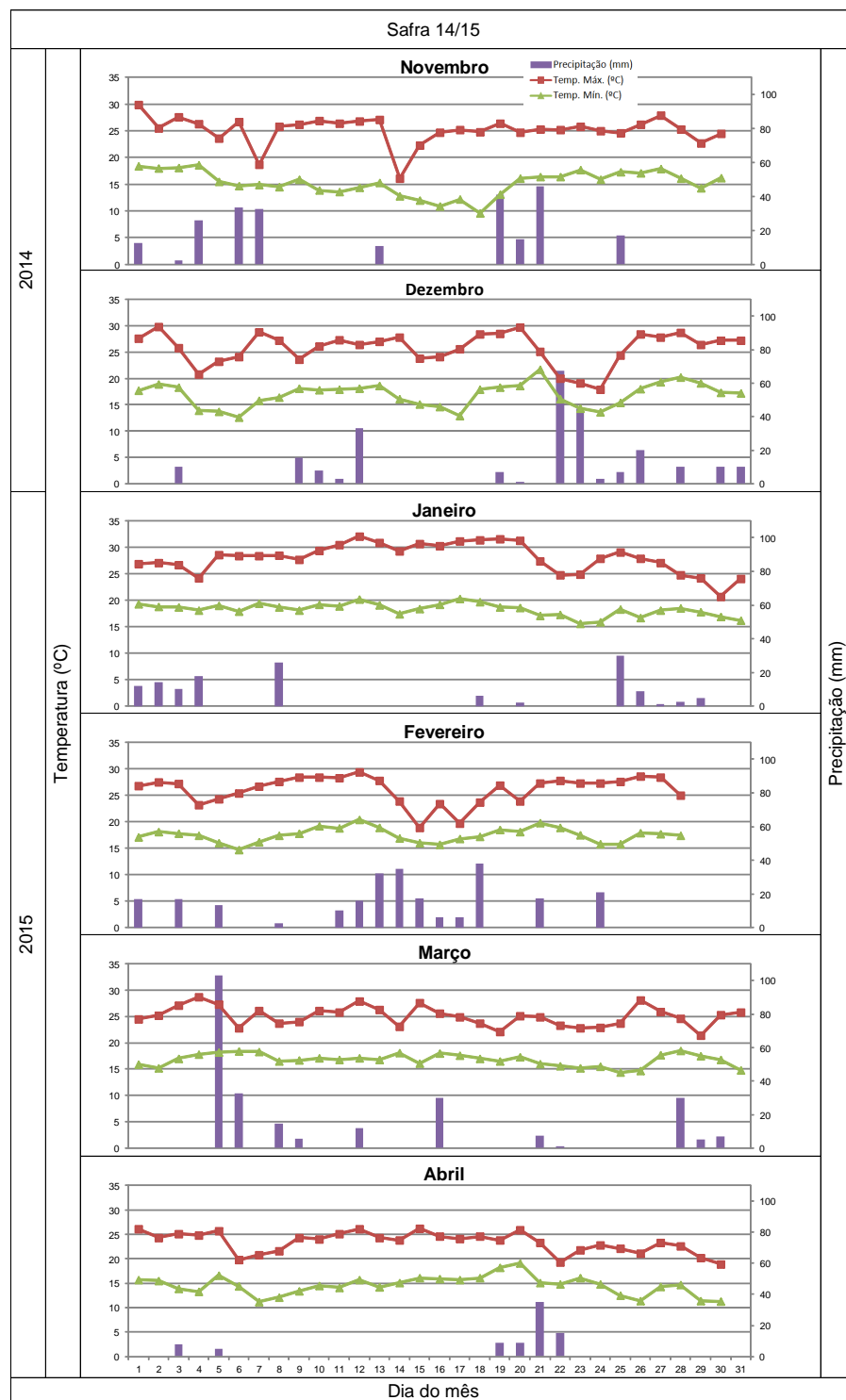
WAKELIN, A.; GUPTA, V. V. S. R.; HARVEY, R.; AND RYDER, M. H.. The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 106–115, 2007.

WU, Q.; ZOU, Y.; HE, X.; LUO, P.. Arbuscular mycorrhizal fungi can alter some root characters and physiological status in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. **Plant Growth Regulator** v. 65, p. 273–278, 2011. DOI 10.1007/s10725-011-9598-6.

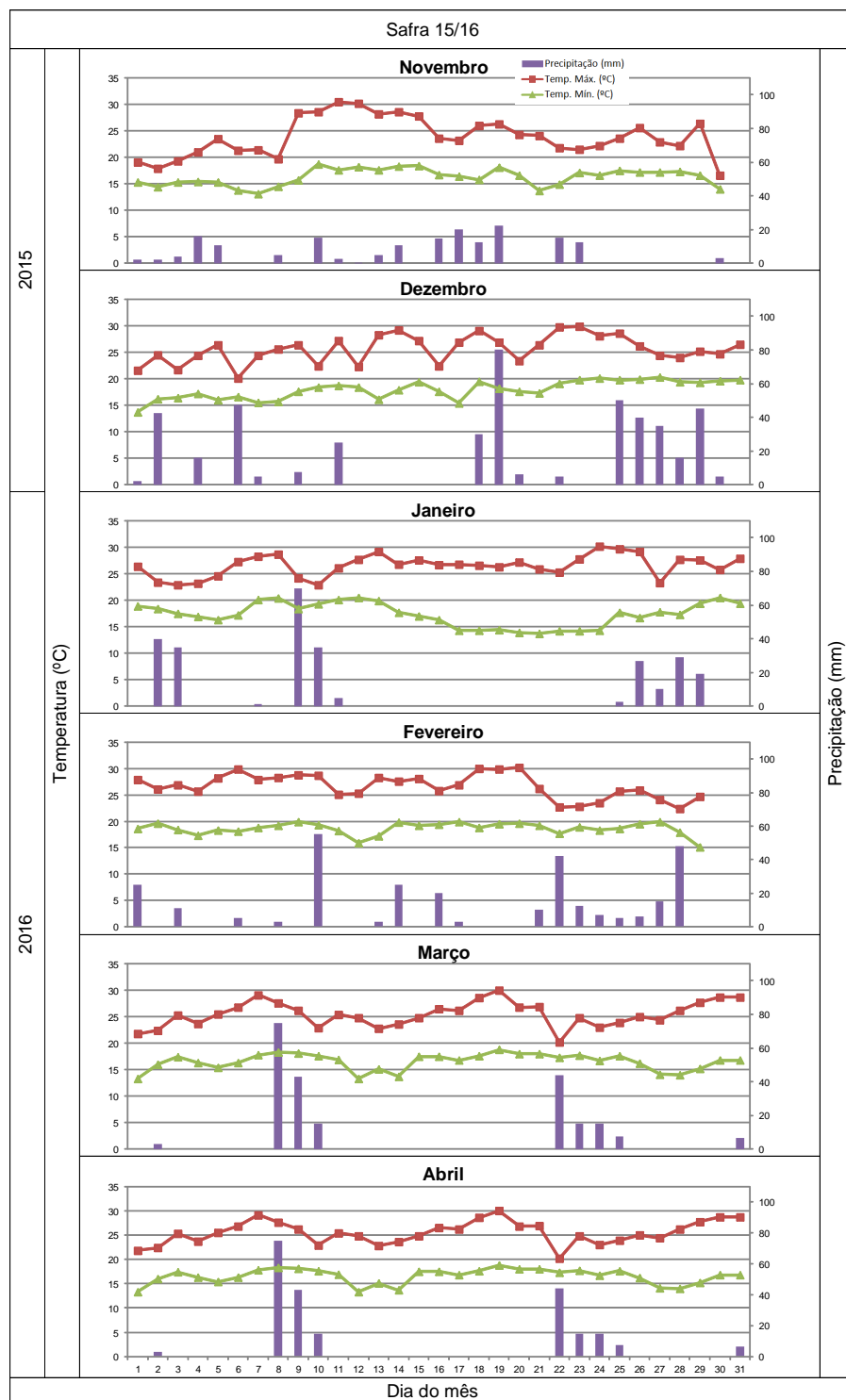
YUSUF, R. I.; SIEMENS, J. C.; BULLOCK, D. G.. Growth analysis of soybean under no-tillage and conventional tillage systems. **Agronomy Journal**. v. 91, p. 928–933, 1999.

ZOBEL, R. W.; KINRAIDE, T. B.; BALIGAR, V. C.. Fine root diameters can change in response to changes in nutrient concentrations. **Plant and Soil**. v. 297, p. 243–254, 2007. DOI 10.1007/s11104-007-9341-2

APÊNDICE A – PRECIPITAÇÃO, TEMPERATURA MÁXIMA E TEMPERATURA MÍNIMA DIÁRIA NOS MESES DE NOVEMBRO E DEZEMBRO DE 2014, JANEIRO, FEVEREIRO, MARÇO E ABRIL DE 2015, REFERENTES AO ANO SAFRA 2014/2015, NA EEACG, MUNICÍPIO DE PALMEIRA, PR. CURITIBA, 2017.



APÊNDICE B – PRECIPITAÇÃO, TEMPERATURA MÁXIMA E TEMPERATURA MÍNIMA DIÁRIA NOS MESES DE NOVEMBRO E DEZEMBRO DE 2015, JANEIRO, FEVEREIRO, MARÇO E ABRIL DE 2016, REFERENTES AO ANO SAFRA 2015/2016, NA EEACG, MUNICÍPIO DE PALMEIRA, PR. CURITIBA, 2017.



APÊNDICE C – DADOS DE MANEJO DE ERVAS INVASORAS, PRAGAS E DOENÇAS, DATAS, PERÍODO DO DIA, TEMPERATURA (TEMP.), UMIDADE RELATIVA DO AR (UR) EM QUE OCORRERAM AS APLICAÇÕES, PRODUTOS, SUAS CONCENTRAÇÕES E DOSE UTILIZADAS NOS ENSAIOS CONDUZIDOS NA EEACG, EM PALMEIRA, PR, NA SAFRA 2014/15. CURITIBA, PR, 2017.

Manejo da cultura	Data	Período	Temp . (°C)	UR (%)	Produto e Concentração	Dose (L ou Kg.ha ⁻¹)
Dessecação pre plantio	05/11/2014	matutino	22	65	Glifosato 360g.L ⁻¹	3,5
Dessecação pre plantio	05/11/2014	matutino	22	65	2,4-D 806g.L ⁻¹	1,5
Dessecação pre emergência	29/11/2014	matutino	23	63	Glifosato 360g.L ⁻¹	2,5
Dessecação pre emergência	29/11/2014	matutino	23	63	Óleo mineral 428g.L ⁻¹	0,5
Controle de pragas	09/12/2014	matutino	22	65	<i>B. thuringiensis</i> 48g.L ⁻¹	0,5
Controle de pragas	20/12/2014	vespertino	24	63	<i>B. thuringiensis</i> 48g.L ⁻¹	0,5
Controle de pragas	20/12/2014	vespertino	24	63	Clorfenapir 240g.L ⁻¹	0,5
Dessecação pos emergência	20/12/2014	vespertino	24	63	Glifosato 360g.L ⁻¹	1,8
Dessecação pos emergência	20/12/2014	vespertino	24	63	Óleo mineral 428g.L ⁻¹	0,5
Controle de pragas	27/01/2015	matutino	23	62	Zeta-cipermetrina 350g.L ⁻¹	0,3
Controle de pragas	27/01/2015	matutino	23	62	Difenoconazol 250g.L ⁻¹	0,2
Controle de doenças	19/02/2015	vespertino	22	65	Picoxistrobina 200g.L ⁻¹ , Ciproconazole 80g.L ⁻¹	0,3
Controle de pragas	19/02/2015	vespertino	22	65	Teflubenzurom 150g.L ⁻¹	0,05
Controle de doenças	02/03/2015	matutino	23	64,5	Picoxistrobina 200g.L ⁻¹ , Ciproconazole 80g.L ⁻¹	0,4
Controle de pragas	02/03/2015	matutino	23	64,5	Alfacipermetrina 75g.L ⁻¹ , Teflubenzurom 75g.L ⁻¹	0,12
Controle de pragas	02/03/2015	matutino	23	64,5	Bifentrina 50g.L ⁻¹ , Carbosulfano 150g.L ⁻¹	0,3

FONTE: EEACG/BUSO (2017).

APÊNDICE D – DADOS DE MANEJO DE ERVAS INVASORAS, PRAGAS E DOENÇAS, DATAS, PERÍODO DO DIA, TEMPERATURA (TEMP.), UMIDADE RELATIVA DO AR (UR) EM QUE OCORRERAM AS APLICAÇÕES, PRODUTOS, SUAS CONCENTRAÇÕES E DOSE UTILIZADAS NOS ENSAIOS CONDUZIDOS NA EEACG, EM PALMEIRA, PR, NA SAFRA 2015/16. CURITIBA, PR, 2017.

Manejo da cultura	Data	Período	Temp . (°C)	UR (%)	Produto e Concentração	Dose (L ou Kg.ha ⁻¹)
Dessecação pre plantio	20/10/2015	matutino	20	68	Glifosato 360g.L ⁻¹	3,5
Dessecação pre plantio	20/10/2015	matutino	20	68	2,4-D 806g.L ⁻¹	1,5
Dessecação pre emergência	16/11/2015	matutino	25	64	Glifosato 360g.L ⁻¹	2,5
Dessecação pre emergência	16/11/2015	matutino	25	64	Óleo mineral 428g.L ⁻¹	0,5
Controle de pragas	23/12/2015	vespertino	24	63	<i>B. thuringiensis</i> 48g.L ⁻¹	0,5
Controle de doenças	23/12/2015	vespertino	24	63	Picoxistrobina 130g.L ⁻¹ , Metconazol 80g.L ⁻¹	0,5
Dessecação pos emergência	23/12/2015	vespertino	24	63	Glifosato 360g.L ⁻¹	2,0
Dessecação pos emergência	23/12/2015	vespertino	24	63	Óleo mineral 428g.L ⁻¹	0,5
Controle de pragas	05/02/2016	matutino	26	61	<i>B. thuringiensis</i> 48g.L ⁻¹	0,5
Controle de doenças	05/02/2016	matutino	26	61	Picoxistrobina 333g.L ⁻¹ , Fluxapirroxade 167g.L ⁻¹	0,2
Controle de pragas	05/02/2016	matutino	26	61	Clorantraniliprole 200g.L ⁻¹	0,05
Controle de doenças	02/03/2016	matutino	25	62	Mancozebe 750g.L ⁻¹	2,0
Controle de doenças	02/03/2016	matutino	25	62	Trifloxistrobina 150g.L ⁻¹ , Protiocanazol 175g.L ⁻¹	0,4
Controle de doenças	02/03/2016	matutino	25	62	Fluazinam 500g.L ⁻¹	1,0
Controle de pragas	02/03/2016	matutino	25	62	Acetamiprido 100g.L ⁻¹ , Alfa-cipermetrina 200g.L ⁻¹	0,3

FONTE: EEACG/BUSO (2017).